N° d'ordre CNRS : A.O. 6627
Année 1972

THÈSE

présentée

AU CENTRE UNIVERSITAIRE DE MARSEILLE - LUMINY
UNIVERSITÉ D'AIX - MARSEILLE II

pour obtenir

LE GRADE DE DOCTEUR ES-SCIENCES PHYSIQUES

par

Jean-Michel LEBEAULT

METABOLISME DES ALCANES CHEZ CANDIDA TROPICALIS

Soutenue le 10 Mars 1972 devant la Commission d'examen

MM. J.-C. SENEZ Président

P. DESNUELLE
J. RICARD
E. AZOULAY
} Examinateurs

N° d'ordre CNRS : A.O. 6627
Année 1972

THÈSE

présentée

AU CENTRE UNIVERSITAIRE DE MARSEILLE - LUMINY
UNIVERSITÉ D'AIX - MARSEILLE II

pour obtenir

LE GRADE DE DOCTEUR ES-SCIENCES PHYSIQUES

par

Jean-Michel LEBEAULT

METABOLISME DES ALCANES CHEZ CANDIDA TROPICALIS

Soutenue le 10 Mars 1972 devant la Commission d'examen

MM. J.-C. SENEZ Président

P. DESNUELLE
J. RICARD
E. AZOULAY
} Examinateurs

N° d'ordre CNRS : A.O. 6627

Année 1972

THÈSE

présentée

AU CENTRE UNIVERSITAIRE DE MARSEILLE - LUMINY
UNIVERSITÉ D'AIX - MARSEILLE II

pour obtenir

LE GRADE DE DOCTEUR ES-SCIENCES PHYSIQUES

par

Jean-Michel LEBEAULT

METABOLISME DES ALCANES CHEZ CANDIDA TROPICALIS

UNIV.
LEIDEN
BIBL.

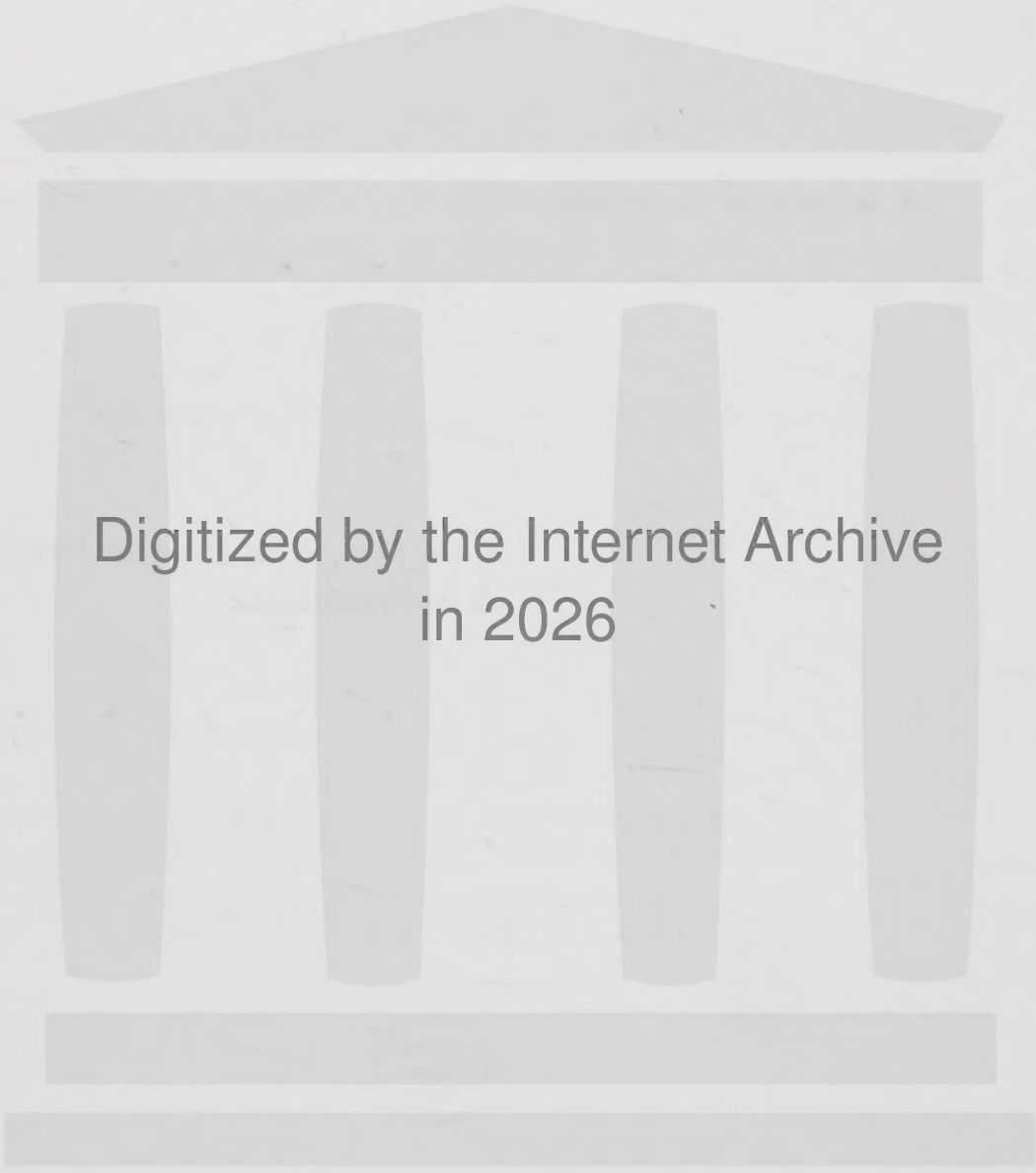
Soutenue le 10 Mars 1972 devant la Commission d'examen

MM. J.-C. SENEZ Président

P. DESNUELLE
J. RICARD
E. AZOULAY
Examinateurs

A la mémoire de ma mère

A mon père, à ma femme en témoignage de reconnaissance


Digitized by the Internet Archive
in 2026

https://archive.org/details/IA41547004_0023

A Monsieur le Professeur Jacques C. SENEZ, Directeur du Laboratoire de Chimie Bactérienne du C.N.R.S. et à Monsieur Bernard LAINE, Directeur technique de BP Protein, qui ont bien voulu m'associer à l'exaltante aventure scientifique et industrielle qu'est la production de levures alimentaires à partir d'hydrocarbures. Qu'ils veuillent bien trouver ici l'expression de ma profonde reconnaissance.

A Monsieur Edgard AZOULAY, Maître de Recherche au C.N.R.S. et à Monsieur le Professeur M.J. COON, Président du Département de Biochimie de l'Université de Michigan (U.S.A.) pour les directives, les conseils et encouragements qu'ils m'ont prodigués et pour l'intérêt qu'ils ont pris au développement de ce travail, je tiens à exprimer ici l'expression de ma très profonde gratitude.

Je remercie Messieurs les Professeurs P. DESNUELLE et J. RICARD qui ont bien voulu me faire l'honneur de participer à mon Jury de thèse.

Je remercie également les chercheurs et techniciens du Laboratoire de Chimie Bactérienne du C.N.R.S. et tout particulièrement Bernadette ROCHE et Zdravko DUVNJAK pour l'aide et l'amitié qu'ils m'ont témoignées durant mon long séjour parmi eux.

J'exprime ma reconnaissance à la Société Française des Pétroles BP grâce à qui j'ai pu réaliser ce travail.

UNIVERSITE D'AIX-MARSEILLE

U.E.R. EXPERIMENTALE ET PLURIDISCIPLINAIRE DE LUMINY

Président de l'Université d'Aix-Marseille : M. H. GASTAUD

Directeur de l'U.E.R. : M. A. ARAGNOL

Chef des Services Administratifs : M. M. CONNAT

PROFESSEURS

MM.	A. ARAGNOL	Mathématiques
	R. BUVAT	Cytologie et Biologie Végétale
	G. DUCET	Biologie
	D. KASTLER	Physique théorique
	R. MONIER	Chimie Biologique
	H. MOREL	Analyse numérique
	J. PAILLARD	Psychophysiologie
	A. PENELOUX	Chimie
	J. RICARD	Physiologie Végétale
	D. ROBINSON	Physique
	L. SAVIDAN	Chimie systématique
	J. SENEZ	Microbiologie
	J. STARKA	Microbiologie

PROFESSEURS SANS CHAIRE ET MAITRES DE CONFERENCES

MM.	H. BACRY	Physique
	E. BIANCO	Mathématiques

MM.	M. BIENFAIT	Physique
Mme	L. CARBONNEL	Chimie
MM.	J. CARMONA	Mathématiques
	A. COLMERAUER	Mathématiques
	J.M. DEBEVER	Physique
	C. FLORES	Psychologie
	J. HANUS	Physique
	O. LEWANDOWSKI	Sociologie
Mme	A. PRELLER-ELLISON	Mathématiques
MM.	G. RAUZY	Mathématiques
	Y. THOUVENY	Biologie
	G. WEISBUCH	Physique
	G. ZELLER-MEIER	Mathématiques

CHARGES DE COURS

MM.	M. BENARROCHE	Physique
	R. ROSSET	Génétique

INTRODUCTION

L'étude du métabolisme des alcanes chez les micro-organismes , bien que relativement récente, a déjà fait l'objet de nombreuses publications. L'analyse de la littérature montre que deux voies d'approche différentes ont été suivies. La première consiste essentiellement à déterminer la nature des produits accumulés par les cellules au cours de la dégradation des alcanes et la seconde à isoler et étudier les différentes enzymes qui interviennent dans ce métabolisme.

Les renseignements relatifs au métabolisme des hydrocarbures paraffiniques à chaîne droite ont été obtenus presque exclusivement à partir de bactéries et ont montré que, chez différentes espèces bactériennes, ce métabolisme est semblable et varie seulement au niveau de l'oxydation primaire de la molécule. Ainsi, suivant GHOLSON et coll. (1963), le métabolisme débute par une hydroxylation de la molécule en présence de NADH et d'oxygène moléculaire, tandis que d'après SENEZ et AZOULAY (1961a 1961b) la transformation de l'alcane en alcool primaire implique une réduction du NAD en présence d'oxygène moléculaire et d'ATP.

La culture des levures sur hydrocarbures présente un intérêt particulier pour la production industrielle de biomasse à des fins alimentaires. Les études entreprises avec ces organismes ont porté essentiellement sur leurs conditions de développement et accessoirement sur l'identification des produits formés au cours de la croissance. Les résultats obtenus quant à la nature du métabolisme chez les levures sont en grande partie inspirés par des recherches de caractère appliqué. Les nombreux travaux réalisés dans cette optique traitent donc surtout du développement de levures du genre *Candida* et en particulier *C. tropicalis*, ce dernier organisme étant considéré comme le plus intéressant pour l'obtention de biomasse (CHAMPAGNAT et coll., 1963 ; AZOULAY et coll., 1964).

Nous inspirant des travaux réalisés avec les bactéries, il nous a paru intéressant d'élucider chez *C. tropicalis* la nature des voies enzymatiques impliquées dans la transformation métabolique des alcanes. Pour ce faire, nous avons utilisé la souche 101, isolée par DUVNJAK et coll. (1970b) et sélectionnée pour sa particularité de se développer sur tétradécane avec d'excellents rendements.

Nous nous sommes proposés non seulement de déterminer le mécanisme de dégradation des alcools, aldéhydes et acides gras résultant de l'oxydation des alcanes, mais aussi et surtout de déterminer le mécanisme d'oxydation primaire de la molécule d'alcane et de définir les conditions expérimentales dans lesquelles cette oxydation s'effectue.

Nous avons ainsi été amenés à rechercher si les deux voies d'oxydation primaire déjà mentionnées existent chez ces micro-organismes, puis à étudier les différentes enzymes impliquées dans les autres étapes de la transformation de l'alcane en acide gras.

CHAPITRE I

EXPOSE BIBLIOGRAPHIQUE

Il ressort de l'abondante littérature existante que les organismes capables de métaboliser les hydrocarbures sont extrêmement répandus dans la nature. En 1895, MIYOSHI a été le premier à montrer que le champignon *Botrytis cinerea* est capable d'oxyder les hydrocarbures paraffiniques. En 1906 RAHN montre qu'une autre moisissure, *Penicillium glaucum*, peut utiliser les paraffines comme seule source de carbone et d'énergie. Quelques années plus tard, SÖHNGEN (1913) isole de nombreuses souches bactériennes susceptibles de se développer aux dépens des hydrocarbures paraffiniques.

La plupart des travaux ultérieurs traitent essentiellement des méthodes d'isolement et de classification de ces micro-organismes. Les nombreuses publications consacrées à ces sujets ont été discutées et analysées dans plusieurs revues générales, en particulier celles de ZOBELL (1946, 1950), d'APPERT (1952), de BEERSTECHER (1954), de VAN DER LINDEN et THIJSSE (1965), de Mc KENNA et KALLIO (1965), KLUG et MARKOVETZ (1971). De cette littérature, il ressort que les micro-organismes capables de dégrader les hydrocarbures sont ubiquitaires et peuvent être isolés à partir des sédiments et des milieux marins les plus divers. Mais c'est surtout à partir du sol et d'eaux résiduaires industrielles, que de nombreuses souches ont été isolées (DAVIS, 1969).

Pour leur développement, ces micro-organismes peuvent utiliser pratiquement toutes les catégories d'hydrocarbures paraffiniques, isoparaffiniques, cycloparaffiniques et aromatiques. Toutefois, la nature des substrats utilisés est très variable d'un groupe d'organismes à l'autre. C'est ainsi que *Pseudomonas aeruginosa* dégrade les paraffines normales, mais est incapable de se développer aux dépens des cycloparaffines ou des hydrocarbures aromatiques (KONOVALTSHIKOFF-MAZOYER et SENEZ, 1956). Cependant, comme le résume SENEZ (1969), "quelle que soit leur appartenance taxonomique, les micro-organismes du pétrole possèdent deux caractéristiques communes : d'une part, aucun d'entre eux n'est lié spécifiquement à la dégradation des hydrocarbures ; ils sont tous également capables de dégrader et d'utiliser comme substrat de croissance d'autres composés carbonés. D'autre part, la dégra-

dation des hydrocarbures est un processus essentiellement aérobie".

MECANISMES BIOCHIMIQUES DE DEGRADATION DES PARAFFINES PAR LES MICRO-ORGANISMES

L'étude biochimique et enzymologique du métabolisme des hydrocarbures est relativement récente et s'est trouvée directement liée au développement des méthodes analytiques, en particulier de la chromatographie en phase gazeuse, de la spectrophotométrie infra-rouge et l'utilisation des molécules marquées. Ces méthodes ont permis d'identifier les produits d'oxydation des hydrocarbures formés au cours des cultures ou dans des systèmes contenant des cellules non proliférantes ou des préparations acellulaires de micro-organismes. Nous analyserons les travaux qui ont permis à de nombreux auteurs de proposer un schéma de dégradation à partir de l'analyse des produits d'oxydation des hydrocarbures par des suspensions bactériennes, puis, dans une deuxième partie, par des extraits acellulaires.

1.- Oxydation des hydrocarbures par les cellules entières de micro-organismes

a) Les alcanes

En 1956, SENEZ et KONOVALTSCHIKOFF-MAZOYER, furent parmi les premiers à suggérer que l'attaque primaire d'un alcane s'effectue au niveau d'un groupement méthyle terminal. En effet, ces auteurs ont démontré l'accumulation d'acide heptanoïque dans les cultures de *P. aeruginosa* sur n-heptane. En plus de l'acide heptanoïque, ils ont également détecté les acides hexanoïque, valérianique, butyrique, propionique et acétique, qu'ils ont de ce fait considéré comme étant des produits intermédiaires de dégradation de l'acide heptanoïque. Par la suite STEWART et coll. (1959a) ont isolé le cétylpalmitate à partir d'une culture de *Micrococcus cerificans* sur n-hexadécane, ce qui suggère que ce composé est formé à partir de l'hexadécanol et de l'acide palmitique, étapes intermédiaires dans le métabolisme de l'hexadécane par cette bactérie. HEYDEMAN (1960) et PROCTOR (1960) ont isolé à partir de cultures de *Pseudomonas* sur alcanes, les alcools primaires correspondant aux hydrocarbures dégradés.

STEWART et coll. (1959) ont mis en évidence l'incorporation de $^{18}O_2$ dans le cétylpalmitate accumulé dans les cultures de *Micrococcus cerificans* sur hexadécane, ce qui démontre la participation de l'oxygène moléculaire et d'une oxygénase dans la conversion des alcanes en alcool (figure 1). Dans le même ordre d'idée, IMELICK (1948a, 1948b) avait antérieurement observé la formation intermédiaire d'hydropéroxyde. Par la suite LEADBETTER et FOSTER (1960) ont proposé un mécanisme de réaction radicalaire concordant avec l'hypothèse précédente et permettant d'expliquer la formation des méthylcétones produites au cours de l'oxydation des alcanes par certains organismes (FOSTER, 1962 - figure 2).

Le fait que l'oxydation porte sur un groupement méthyle terminal a été confirmé par le marquage radioactif en position 1 de l'alcool cétylique et de l'acide palmitique formés à partir d' hexadécane-1-C^{14}. En ce qui concerne l'incorporation de l'oxygène lourd, des résultats semblables à ceux de Stewart ont été obtenus avec d'autres bactéries cultivées à partir d'hydrocarbures gazeux sous atmosphère enrichie en $^{18}O_2$.

Dans un tout autre ordre d'idées, la formation en anaérobiose de 1-heptène à partir de n-heptane par une suspension non proliférante de *P. aeruginosa* (SENEZ et AZOULAY, 1961 ; CHOUTEAU et coll., 1962 ; AZOULAY, 1966), conduit à envisager un mécanisme différent caractérisé par une déshydrogénation initiale de l'alcane. La formation d'alcène à partir d'alcane par des levures ou par des bactéries a par la suite été confirmée par WAGNER et coll. (1967) et IIZUKA et coll. (1968, 1969). Ces derniers auteurs ont pu d'une part démontrer la formation en anaérobiose de 1-décène à partir de n-décane par des suspensions non proliférantes de *C. rugosa* et d'autre part la formation de 1-décanol à partir de 1-décène par ces mêmes cellules.

b) Les alcènes

L'alcène pouvant constituer un intermédiaire dans la dégradation des alcanes, il est important d'en étudier le métabolisme. Les alcènes sont de bons substrats de croissance pour de nombreux micro-organismes (BEERSTECHER, 1954 ; FOSTER, 1962 ; MARKOVETZ et KALLIO, 1964), mais le mécanisme de leur dégradation fait l'objet d'interprétations diverses.

BRUYN (1954) a isolé le 1.2 hexadecanediol à partir de culture de *Candida lipolytica* sur 1-hexadécène. La formation de ce diol a été confirmée par STEWART et coll. (1960) chez le même micro-organisme, mais n'a jamais été démontrée chez les bactéries (THIJSSE et VAN DER LINDEN, 1963). Il

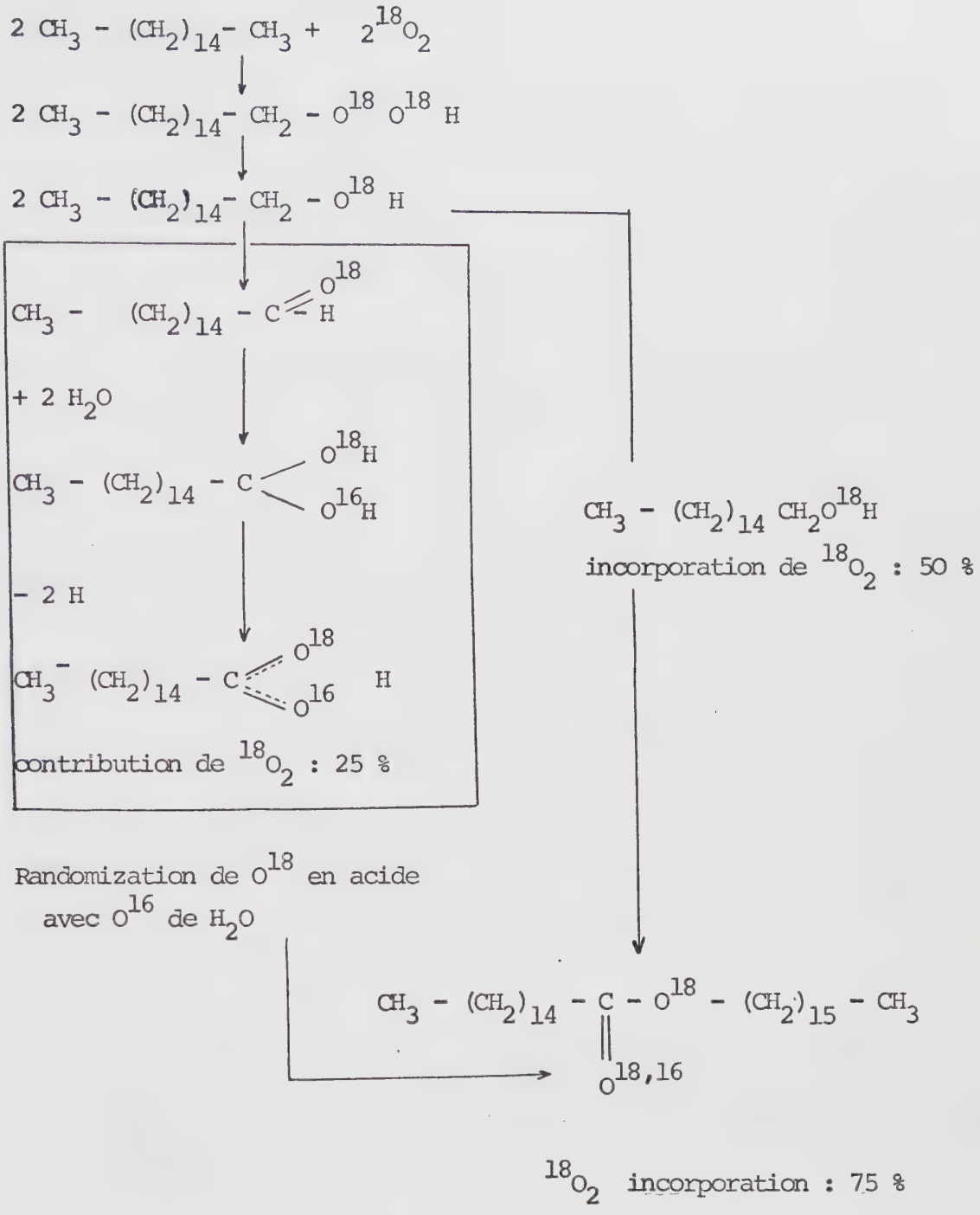


Figure 1 - Schéma de dégradation du n-hexadécane par *Micrococcus cerificans* suivant STEWART et coll. (1959).

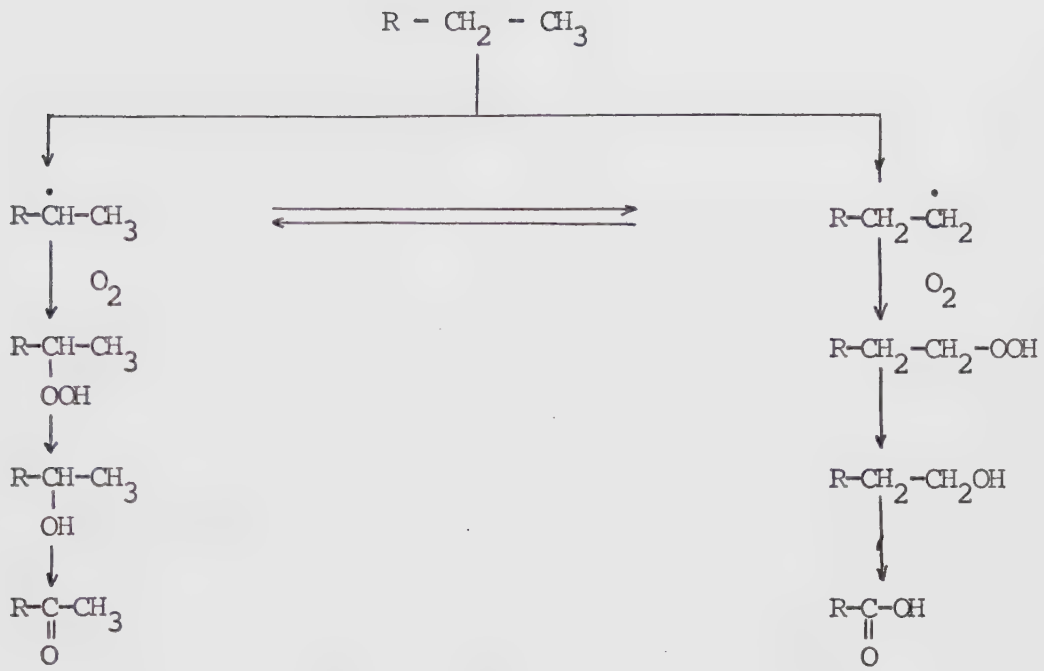


Figure 2 - Mécanisme radicalaire de dégradation des alcanes (LEADBETTER et FOSTER (1960). Suivant que le radical est primaire ou secondaire, l'oxydation conduit respectivement à l'acide, ou à la méthyl-cétone correspondante.

semble que certaines souches de *Pseudomonas* oxydent préférentiellement l'extrémité saturée des oléfines, comme le suggère la formation, en présence de chloramphénicol, d'acide 6-hepténoïque à partir du 1-heptène. VAN DER LINDEN (1963) a d'autre part démontré la formation d'époxyde à partir de l'alcène et proposé le schéma de dégradation représenté sur la figure 3.

KLUG et MARKOVETZ (1967) ont étudié la dégradation du 1-tétradécène par *P. aeruginosa* sol 20. La formation d'acide 13-tétradécénoïque a été démontrée. Cependant les auteurs n'écartent pas l'hypothèse que la formation de ce composé pourrait résulter d'un métabolisme indépendant de la voie principale, ce qui expliquerait son accumulation dans les milieux de culture. Corrélativement, ils pensent que l'acide insaturé pourrait soit être dégradé très lentement, soit pas du tout, comme le suggère le fait qu'ils n'ont jamais pu mettre en évidence les acides insaturés en C_{12} ou C_{10}. Cependant, pour ces auteurs, le fait que *P. aeruginosa* ne pousse pas sur 1.13-tétradécadiène jette un doute quant à la possibilité que l'alcène soit un intermédiaire dans l'oxydation des alcanes. Les mêmes auteurs (1968) ont par ailleurs étudié la dégradation du 1-hexadécène par *C. lipolytica* et l'identification de différents composés leur a permis de proposer le schéma de dégradation des alcènes représenté sur la figure 4.

c) Oxydation diterminale des alcanes

Nous avons considéré jusqu'ici l'oxydation monoterminale des hydrocarbures saturés ou insaturés conduisant à la formation d'un acide gras.

THIJSSE et VAN DER LINDEN (1961) ont montré que l'oxydation du 2-méthyl-hexane conduit, soit à la formation de l'acide 2-méthylhexanoïque, soit à la formation de l'acide 5-méthylhexanoïque, mais qu'aucun diacide n'est formé. Cependant KESTER et FOSTER (1963) ont isolé des diacides dans des cultures de *Corynebacterium* sur n-alcane, ce qui correspond à l'attaque simultanée des deux extrémités de la molécule ou à l'ω-oxydation secondaire d'un acide gras.

ALI-KHAN et coll. (1963) ont également constaté la formation d'acide octanedioïque et hexanedioïque dans des cultures de *Pseudomonas* sur n-octane.

Plus récemment OGINO et coll. (1965) ont proposé pour la dégradation des alcanes par une levure du genre *Pichia* un mécanisme dans lequel

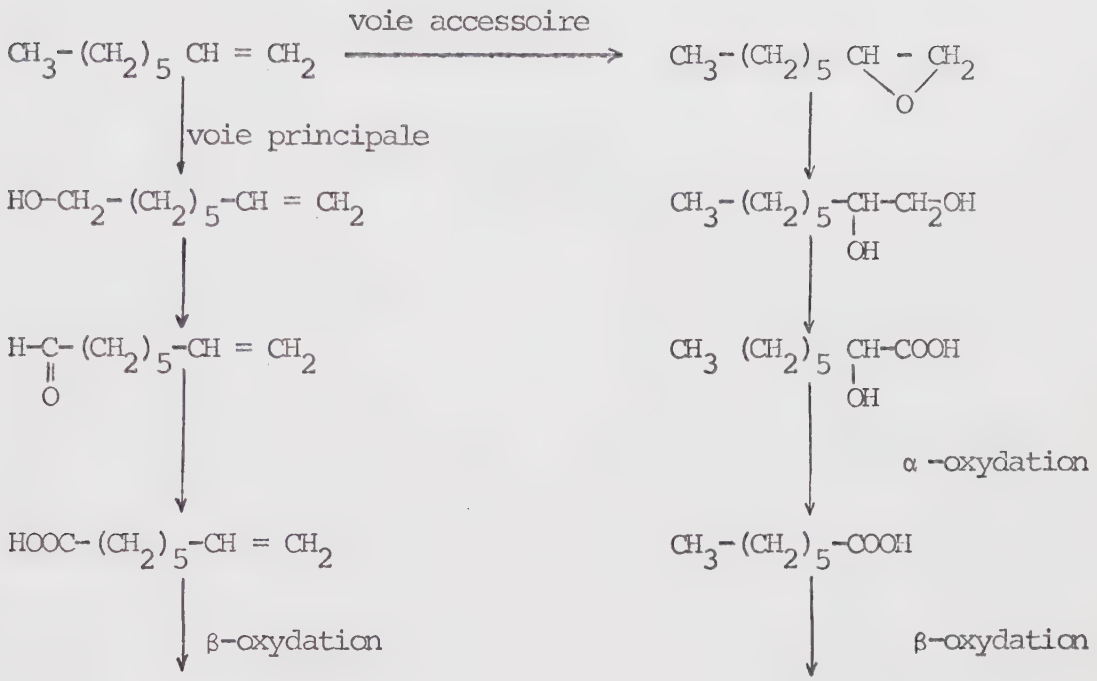


Figure 3 - Dégradation du 1-octène par *Pseudomonas aeruginosa* 473. HUYBREGTSE et VAN DER LINDEN (1964).

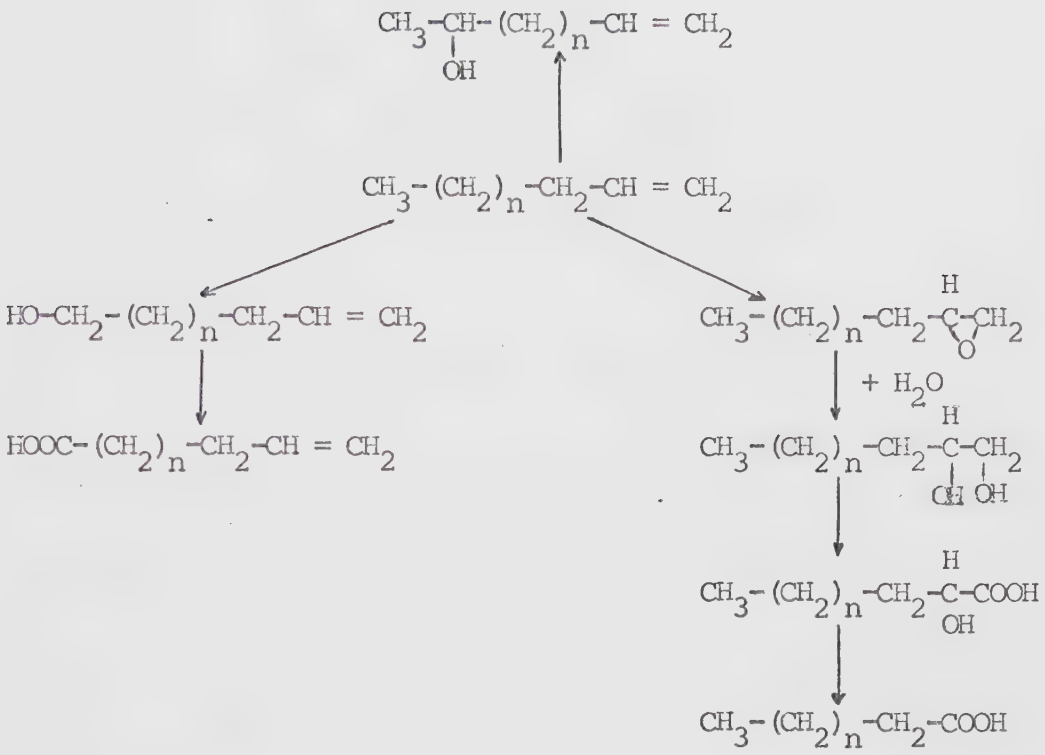


Figure 4 - Schéma de dégradation des alcènes d'après KLUG et MARKOVETZ (1968).

chacun des produits intermédiaires est susceptible d'être hydroxylé en bout de chaîne, puis transformé en diacide. Le mécanisme s'appuie sur la mise en évidence des différents intermédiaires (figure 5).

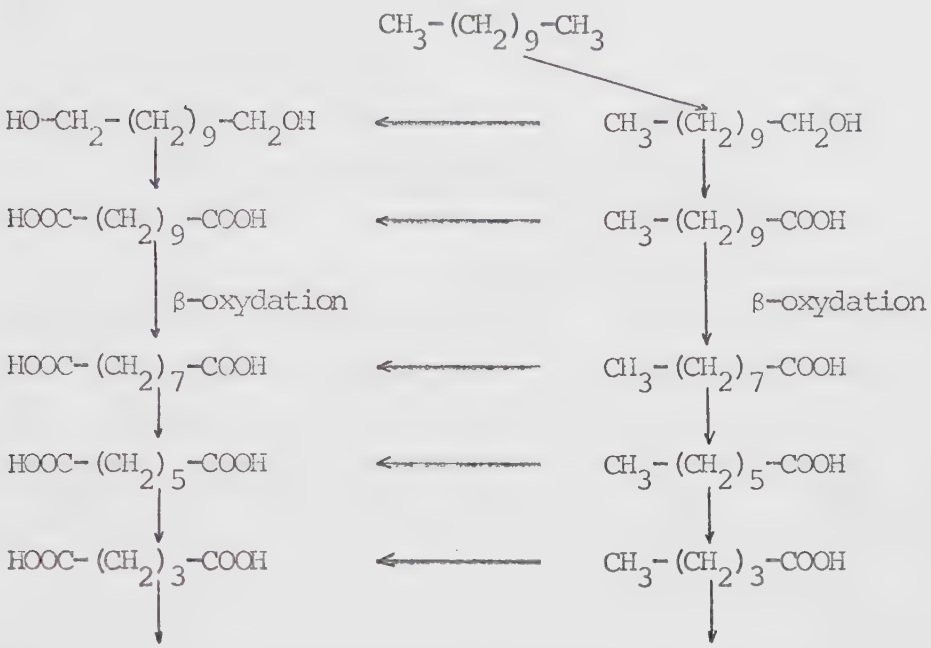


Figure 5 - Dégradation du undécane par une souche de levure du genre *Pichia*. (OGINO et coll., 1965) Oxydation diterminale.

2.- Oxydation des hydrocarbures par des préparations acellulaires

Les enzymes qui catalysent l'incorporation d'oxygène dans un substrat se divisent en deux groupes, les oxygénases et les hydroxylases, selon qu'elles introduisent dans le substrat un ou deux atomes d'oxygène.

a) Les hydroxylases

Les mono-oxygénases ou hydroxylases catalysent l'introduction d'un atome d'oxygène sous forme d'un groupement hydroxyle dans la molécule de substrat, l'autre atome d'oxygène se retrouvant dans l'eau, un donateur d'électrons est évidemment nécessaire : en général ce sont les pyridine-nucléotides réduits.

La réaction générale est représentée par l'équation :

$$RH + O_2 + NAD\ (P)\ H + H^+ \rightarrow ROH + NAD\ (P)^+ + H_2O$$

Le carbone hydroxylé peut appartenir, soit à un noyau aromatique ou cycloparaffinique, soit à une chaîne paraffinique.

Le système hydroxylase a surtout été étudié chez les mammifères et isolé soit à partir du foie, soit à partir des surrénales. On pense généralement qu'il est localisé dans le réticulum endoplasmique des cellules hépatiques et qu'il est constitué par au moins deux protéines, une flavoprotéine et un cytochrome.

1/ La NADPH-cytochrome C réductase

De nombreux arguments suggèrent que cette flavoprotéine est la NADPH-cytochrome c-réductase décrite tout d'abord par HORECKER (1950) et plus récemment par LANG et NASON (1959), PHILIPPS et LANGDON (1962). En 1962, WILLIAMS et KAMIN ont purifié l'enzyme et identifié le FAD comme groupement prosthétique. D'après KAMIN et coll. (1965) il y aurait deux molécules de FAD par molécule d'enzyme. Les propriétés de la cytochrome-c-réductase sont décrites dans la revue générale de KAMIN et coll. (1965). L'enzyme catalyse le transfert des électrons du NADPH au cytochrome P_{450} dont le rôle est capital dans les réactions d'hydroxylation. La NADPH-cytochrome c-réductase et l'hydroxylase, sont toutes deux inhibées par le $NADP^+$ de manière compétitive et les constantes d'inhibition sont identiques (WILLIAMS et KAMIN, 1962 ; ORRENIUS, 1965). De plus le cytochrome c oxydé est inhibiteur, même si le NADPH est en excès (ORRENIUS, 1967). L'induction du système hydroxylase entraîne en même temps une induction de la NADPH cytochrome c-réductase ; enfin, la localisation de ces deux activités enzymatiques est identique et leur séparation n'a jamais pu être obtenue, ce qui est en faveur de l'intégration de la NADPH cytochrome c-réductase dans le système hydroxylase.

2/ Cytochrome P_{450}

Cette hémoprotéine doit son nom au fait que le spectre différentiel obtenu entre la forme réduite et combinée à l'oxyde de carbone et la forme réduite présente un maximum d'absorption à 450 mμ.

Ce cytochrome a été décrit en premier lieu par KLINGENBERG (1958), par GARFINDEL (1958) et par OMURA et SATO (1962, 1964a, 1964b). Chez les mammifères, il est localisé dans les microsomes des cellules hépatiques et pour les cellules du cortex surrénal à la fois dans les microsomes

et les mitochondries où il intervient dans l'hydroxylation des stéroïdes. Il a été par ailleurs mis en évidence par TAKESUI et coll. (1965) dans les cellules du rein et des muqueuses intestinales. Par la suite, il a été découvert chez les bactéries (KATAGIRI et coll., 1968 ; GARDINI et JURTSHUK, 1968, 1970) et chez les levures (SMITH, 1964 ; ISHIDATE et coll., 1969, 1969a), mais à ce jour, il n'avait encore été associé à aucune activité métabolique.

Il convient de souligner que, suivant l'origine du cytochrome P_{450} (foie ou cellules surrénales), les systèmes transporteurs d'électrons qui lui sont couplés dans les réactions d'hydroxylation diffèrent, comme l'indique la figure 6.

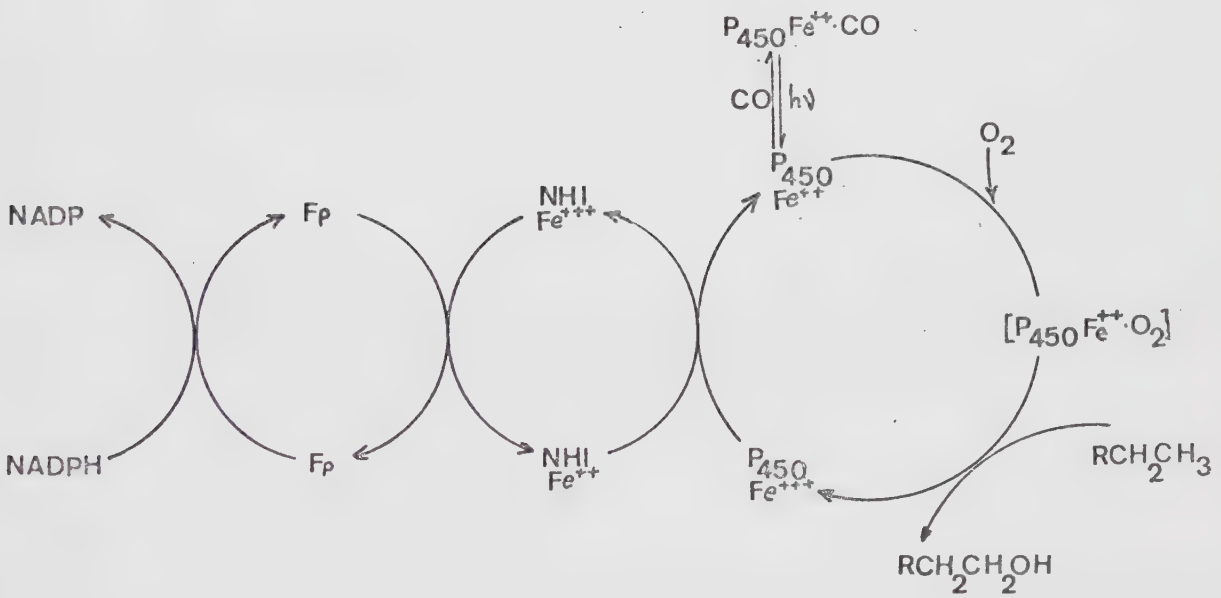


Figure 6 - Système hydroxylase du cortex surrénal d'après OMURA et coll. (1965a).
FP : flavoprotéine ; NHI : "non-heme iron protein" ; P_{450} : cytochrome P_{450} ; hv : dissociation par la lumière du complexe cytochrome-CO. Dans le système microsomal la Non Heme Iron Protein n'a pas été mise en évidence.

3/ Ferredoxines

L'hydroxylation des stéroïdes (KIMURA et SUZUKI, 1965, 1967) et celle du camphre (CUSHMAN, 1967) impliquent, en plus des flavoprotéines et du cytochrome P_{450}, des ferredoxines. Dans le cas de l'hydroxylation du camphre, le schéma de transfert des électrons est donné par la figure 7. Ce système a été d'ailleurs récemment purifié et cristallisé par GUNSALUS et coll. (1970)

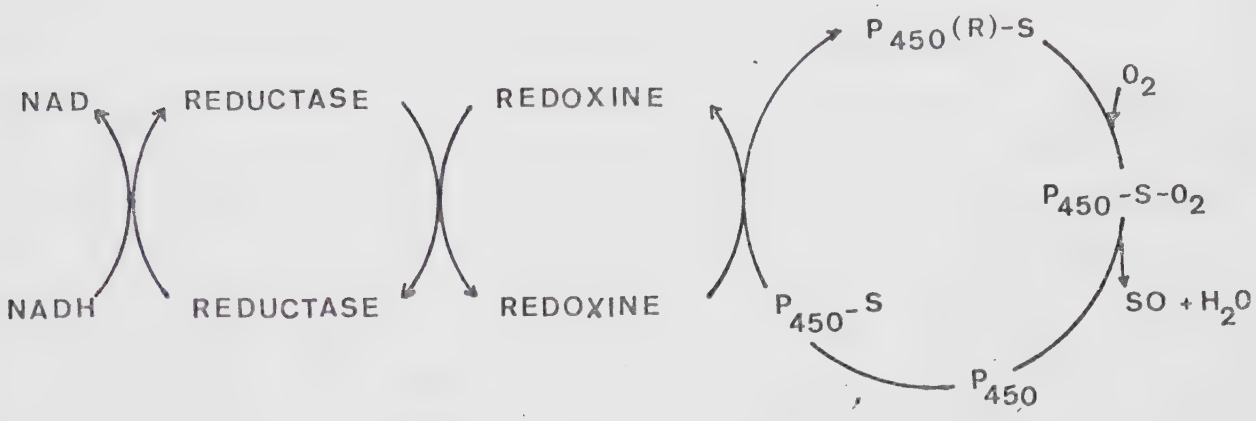


Figure 7 - Hydroxylation du camphre d'après KATAGIRI et coll. (1968)
Le système hydroxylase est composé de trois protéines : une flavoprotéine (réductase) une ferredoxine (rédoxine), et le cytochrome P_{450}. S (substrat).

Quel que soit le système enzymatique considéré, on s'accorde à reconnaître que pour démontrer la participation du cytochrome P_{450} dans une réaction d'hydroxylation, il faut simultanément mettre en évidence :

a) un effet inhibiteur de l'oxyde de carbone, (COONEY et coll., 1957). On doit obtenir une inhibition de 50 % lorsque le rapport CO/O_2 est égal à 1 (OMURA et coll., 1965) ;

b) une insensibilité à KCN, celui-ci ne pouvant ni se combiner avec le cytochrome P_{450} (OMURA et SATO, 1964), ni inhiber la réaction d'hydroxylation (COOPER et BRODIE, 1955 ; GILETTE et coll., 1957 ; ORRENIUS, 1964 ; COOPER et coll., 1965).

3.- Hydroxylation des hydrocarbures par des extraits bactériens

Un système enzymatique catalysant l'hydroxylation des alcanes a été isolé à partir de différentes bactéries. En 1963 BAPTIST et coll. ont montré qu'un extrait acellulaire de *P. oleovorans* peut catalyser, en présence de NADH et d'oxygène moléculaire, la transformation de l'octane en octanol et acide octanoïque ; par précipitation au sulfate d'ammonium, ces auteurs ont mis en évidence deux fractions A et B ne possédant isolément aucune activité enzymatique. Celle-ci est restaurée par le mélange des deux fractions A et B, en présence de NADH. KUSUNOSE et coll. (1964a, 1964b) ont montré par la suite que le système hydroxylase est également actif à l'égard des acides gras qui sont transformés en ω-hydroxyacides.

D'autre part l'ω-oxydation des acides gras a été étudiée par VERKADE et coll. (1932, 1934, 1935a, 1935b). En ce qui concerne les hydrocarbures, KESTER et FOSTER (1959), ALI-KHAN et coll. (1963, 1964) avaient déjà suggéré une ω-oxydation des acides gras formés à partir des alcanes. Le mécanisme d'hydroxylation chez *P. oleovorans* a été particulièrement étudié par PETERSON et coll. (1966, 1967, 1968, 1969). Ces auteurs ont mis en évidence une rubrédoxine, une rubrédoxine-réductase et une hydroxylase, et proposé un mécanisme d'hydroxylation (figure 8). Ce schéma est particulièrement important, car pour la première fois, la rubrédoxine, transporteur d'électrons d'abord mis en évidence chez *C. pasteurianum* est ainsi impliqué dans un mécanisme d'oxydation précis. En 1967, KUSUNOSE et coll. ont confirmé ces résultats avec une souche de *P. denitrificans*.

Plus récemment, CARDINI et JURTSHUK (1968, 1970) ont mis en évidence chez *Corynebacterium* un système hydroxylase catalysant la transformation du n-octane en 1-octanol et acide octanoïque et ont montré que ce système peut être séparé en deux fractions, l'une contenant un cytochrome P_{450} et l'autre une flavoprotéine. Le schéma proposé est résumé sur la figure 9.

Le mécanisme d'hydroxylation des hydrocarbures conduisant à la formation d'alcool primaire est donc très complexe. En outre, la nature des transporteurs d'électrons intermédiaires peut changer d'un organisme à l'autre et même chez les mammifères, d'un tissu à l'autre. Les études stoechiométriques effectuées chez *P. oleovorans* en utilisant les acides gras comme substrats (PETERSON et coll., 1969), montrent que la réaction d'oxydation est bien une réaction d'hydroxylation, comportant l'incorporation d'un seul atome d'oxygène :

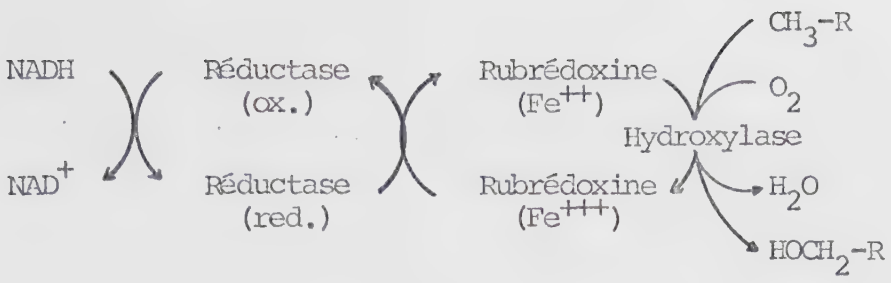


Figure 8 - Système hydroxylase de *Pseudomonas oleovorans* (PETERSON et coll., 1966).

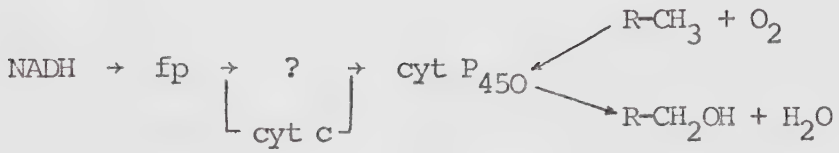


Figure 9 - Système hydroxylase de *Corynebacterium* (CARDINI et JURTSHUK, 1970).
Deux protéines ont été isolées : la NADH cytochrome c-réductase (fp) et le cytochrome P_{450}.

$$R\text{-}CH_3 + NADH + H^+ + {}^{18}O_2 \rightarrow RCH_2\,{}^{18}OH + NAD^+ + H_2\,{}^{18}O$$

Mais on n'échappe pas à la possibilité que cette réaction comporte deux étapes, la première faisant intervenir une formation d'hydropéroxyde qui serait ensuite réduit par une réductase NADH dépendante.

$$R\text{-}CH_3 + O_2 \rightarrow R\text{-}CH_2O\text{-}OH$$

$$R\text{-}CH_2\text{-}O\text{-}OH + NADH + H^+ \rightarrow RCH_2OH + H_2O + NAD^+$$

DESHYDROGENATION DES ALCANES

AZOULAY et SENEZ (1958, SENEZ et AZOULAY (1961), AZOULAY et coll. (1963) ont montré que l'heptane, en présence de NAD et d'extrait de *P. aeruginosa* cultivé sur heptane, est oxydé avec réduction du NAD en NADH. Cette déshydrogénation, qui aboutit en anaérobiose à la formation de 1-heptène, est activée par l'ATP (AZOULAY, 1966). La transformation du 1-heptène en heptanol exige la présence d'oxygène moléculaire, ce qui a conduit à proposer le schéma métabolique de la figure 10. Après la formation de l'oléfine, celle d'un epoxyde est hypothétique mais concorde avec le fait que:en anaérobiose l'alcène s'accumule sans formation d'alcool et que la conversion de l'alcane en alcool primaire puis en acide gras exige l'intervention de l'oxygène moléculaire. Un argument expérimental en faveur de la formation d'un epoxyde est la mise en évidence par HUYBREGSTE et VAN DER LINDEN (1964) de cet intermédiaire dans le cas particulier de l'oxydation de l'heptène par une souche de *Pseudomonas*. L'intervention de l'oxygène dans la conversion de l'oléfine en alcool concorde avec le caractère aérobie obligé du métabolisme des alcanes chez les bactéries et également avec le fait observé par STEWART et coll. (1959), mais différemment interprété par ces auteurs, de l'incorporation de ${}^{18}O_2$ dans l'alcool et dans l'acide gras.

Ce mécanisme de déshydrogénation a été retrouvé par Iizuka et coll. (1970) chez *C. rugosa*.

°

° °

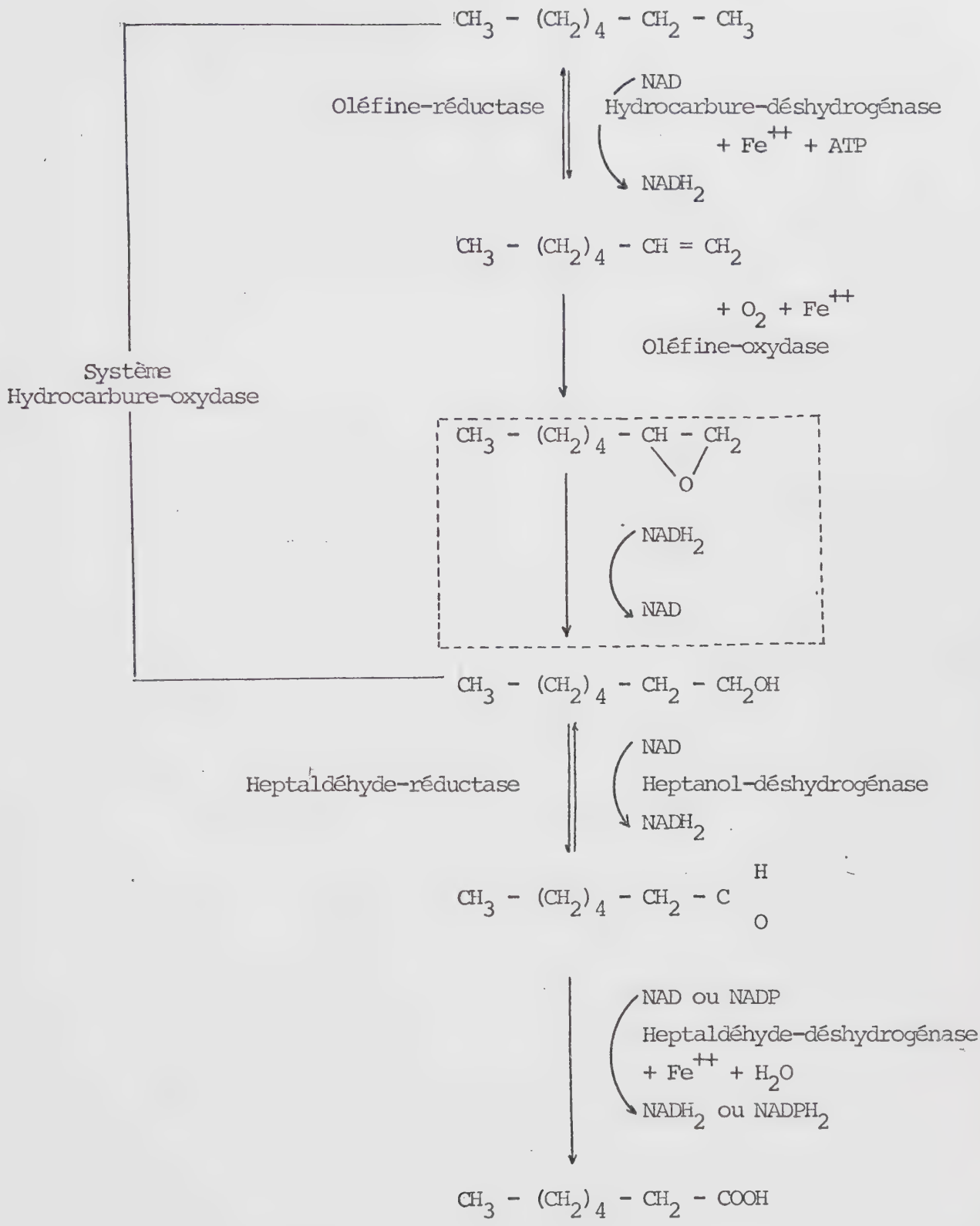


Figure 10 - Schéma des différentes séquences enzymatiques relatives à la transformation du n-heptane en acide heptanoïque par la souche Sol 20 de *P. aeruginosa* (AZOULAY et coll., 1963).

De cet ensemble de travaux, il ressort qu'on a proposé pour l'oxydation des alcanes par les micro-organismes deux voies principales différant entre elles par l'attaque primaire du substrat, celui-ci pouvant être soit hydroxylé, soit déshydrogéné ; dans les deux cas, on arrive toujours à la formation d'alcool primaire. Il est par contre établi qu'à partir de l'alcool primaire, le processus se poursuit par une série de déshydrogénases à pyridine-nucléotides jusqu'à l'acide gras correspondant, lequel est ultérieurement dégradé par β-oxydation (SENEZ et KONOVALTSCHIKOFF-MAZOYER, 1956 ; BAPTIST et COON, 1959 ; DUVNJAK et coll., 1970).

CHAPITRE II

MATERIEL ET METHODES

1.- Organismes

a) Levures

Candida tropicalis souche 101 de la collection de notre laboratoire (DUVNJAK et coll., 1970).

Saccharomyces cerevisiae souche U (ROCHE et AZOULAY, 1969).

b) Bactéries

Les souches de *Micromonospora chalcea* et de *Streptomyces violaceus* nous ont été communiquées par le Professeur VILLANUEVA et la souche de *Pseudomonas oleovorans* par le Professeur M.J. COON.

2.- Milieux et conditions de culture

Milieux de culture : Nous avons employé un milieu de base contenant NH_4Cl : 2,5 g ; KH_2PO_4 : 7 g ; Na_2HPO_4 : 1,2 g ; $MgSO_4$, 7 H_2O : 0,2 g ; NaCl : 0,1 g ; eau distillée : 1 litre. Par litre de ce milieu minéral, nous avons ajouté de l'extrait de levure (Difco Yeast extract) à raison de 1 g pour les cultures de *S. cerevisiae*, et de 100 mg pour celles de *C. tropicalis*. La source de carbone était constituée suivant le cas par du glucose (2 g/l) ou par du n-tétradécane (BDH) (1,5 g/l). Ces cultures sont incubées à 32° C sous agitation vigoureuse, dans un fermenteur New-Brunswick de 12 litres contenant 7 litres de milieu ; l'aération est assurée par injection de 7 litres d'air par minute. Les cellules recueillies en phase exponentielle de croissance par centrifugation, puis lavées 2 fois avec une solution de NaCl à 0,9 % sont remises en suspension dans un tampon Tris-HCl 0,05 M à pH 7,7.

Les croissances sont mesurées par opacimétrie à 450 mμ et exprimées en mg de cellules poids sec en se référant à une courbe étalon. Les

suspensions non proliférantes sont préparées avec des cellules récoltées en phase exponentielle de croissance et lavées deux fois dans une solution de NaCl à 0,9 %.

Pour les deux souches de bactéries (*M. chalcea* et *S. violaceus*), nous avons utilisé des milieux minéraux de bases identiques à ceux décrits par AZOULAY et coll. (1965). A cette solution minérale est ajoutée, comme seule source de carbone et d'énergie, une préparation de parois cellulaires de *C. tropicalis*.

La souche de *Pseudomonas oleovorans* a été cultivée dans les conditions décrites par Mc KENNA et COON (1970).

3.- Préparation des protoplastes

Pour la préparation des protoplastes de cellules de *C. tropicalis* cultivées sur n-tétradécane, nous avons utilisé la méthode décrite par KOVAC et coll. (1968), modifiée par LEBEAULT et coll. (1969a, 1969b). Les conditions de préparation sont les suivantes : Les cellules (1 g poids sec) sont incubées pendant 30 mn à 32° C dans 20 ml de tampon Tris-HCl 0,1 M à pH 9,3 contenant du thioglycollate 0,5 M, puis récoltées par centrifugation pendant 15 mn à 6 000 x g. Après lavage dans du tampon Tris-HCl 0,1 M pH 9,3, les cellules sont finalement incubées pendant 30 mn à 32° dans 10 ml de tampon phosphate-citrate (0,05 M pH 4,1) contenant $MgSO_4$ 1 M, et 1 ml (100 000 unités) d'hélicase (Industrie Biologique Française).

La formation des protoplastes est contrôlée de la manière suivante: A intervalles de temps réguliers des aliquotes de la préparation cellulaire traitée par l'hélicase sont prélevés et dilués 500 fois pour faire éclater les protoplastes. La proportion de ceux-ci est déterminée par l'abaissement en fonction du temps de la densité optique à 450 nm. Le traitement est poursuivi jusqu'à stabilisation de la densité optique (60 minutes environ). Dans ces conditions l'examen microscopique confirme que la quasi totalité (plus de 90 %) des cellules sont converties en protoplastes.

4.- Préparation des extraits enzymatiques

Deux procédés ont été successivement employés pour la préparation des extraits enzymatiques à partir des protoplastes.

A- Choc osmotique et séparation des mitochondries

Cette technique déjà décrite (LEBEAULT et coll., 1970a) consiste à remettre les protoplastes en suspension dans un tampon phosphaté 0,1 M pH 7,7 contenant du $MgSO_4$ 0,25 M, et à homogénéiser et centrifuger à 1 500 x g pendant 10 minutes cette préparation, ce qui élimine dans le culot les cellules encore intactes et les protoplastes non éclatés. Le surnageant est à nouveau centrifugé à 8 000 x g pour séparer les mitochondries. Celles-ci sont remises en suspension dans le même tampon et soumises à deux centrifugations. L'une à 1 200 x g pendant 5 minutes élimine les débris cellulaires. Le culot de l'autre (15 000 x g pendant 12 minutes) est remis en suspension dans le même tampon et constitue la préparation mitochondriale. Cette dernière est soumise à l'action de la digitonine à 0,5 % dans de la diméthyl-formamide afin de provoquer l'éclatement des mitochondries ; après 30 minutes d'incubation à 0° C, le mélange est soumis à l'action des ultrasons pendant 30 secondes dans un Raythéon et centrifugé dans une ultracentrifugeuse Spinco L4 à 220 000 x g pendant 90 minutes. On obtient ainsi des particules mitochondriales et un extrait surnageant.

B - Traitement dans une cellule de pression

La méthode précédente nous a permis de localiser de façon relativement précise les activités enzymatiques étudiées. La méthode suivante, plus simple et plus rapide, a été employée dans de nombreuses expériences.

Les protoplastes sont récoltés par centrifugation à 3 000 x g pendant 10 minutes, puis remis en suspension dans un tampon Tris 0,05 M, pH 7,7 et traités dans une cellule de pression (French Pressure Cell). Les préparations ainsi obtenues contiennent des mitochondries non éclatées, des fractions sub-microsomales, des fragments mitochondriaux, et des protéines solubles. En soumettant ces préparations à une centrifugation à 15 000 x g pendant 12 minutes, on sépare un culot constitué en grande partie par des mitochondries intactes. Ce culot repris par du tampon Tris 0,05 M, pH 7,7 constitue une préparation mitochondriale équivalente à celle obtenue par la méthode décrite dans le paragraphe précédent.

Le surnageant est centrifugé dans une Spinco L4 à 220 000 x g pendant 90 minutes. Les particules de ce nouveau culot sont reprises dans 5 ml de tampon Tris 0,05 M, pH 7,7, puis fractionnées sur une colonne de Sépharose 2B équilibrée avec le même tampon (150 mg de protéines sur une

TABLEAU I - Préparation d'extraits mitochondriaux par traitement de mitochondries avec de la digitonine.

CELLULES

lavées 2 fois avec NaCl 0,9 %, incubation à 32°, 30 mn dans du tampon Tris-HCl 0,1 M pH 9,3 thioglycollate-Na 0,5 M
Centrifugation 6 000 x g - 15 mn

CULOT — SURNAGEANT

Cellules traitées avec hélicase (100 000 unités/g poids sec)
1 (tampon Citrate-phosphate 0,01 M, (pH 4,1 - $MgSO_4$ 1 M
Incubation à 32°, 30-60 mn
Centrifugation 3 000 x g 15 mn

SURNAGEANT — CULOT (Protoplastes)

lavées 3 fois avec milieu 1 centrifugation 1 600 x g 15 mn

SURNAGEANT — CULOT (Protoplastes)

remis en suspension dans du
2 (tampon phosphates 0,1 M (pH 7,7 $MgSO_4$ 0,25 M
Homogénéisation
Centrifugation 1 500 x g 10 mn

SURNAGEANT (Mitochondries) — P

Centrifugation 8 000 x g 20 mn

SURNAGEANT — CULOT

Remis en suspension dans le milieu 2 centrifugation 1 200 x g 5 mn

SURNAGEANT — P

Centrifugation 15 000 x g 12 mn

SURNAGEANT — CULOT (Mitochondries)

Centrifugation 40 000 x g 60 mn

SURNAGEANT — Fraction submicrosomale

Suspension de mitochondries

éclatement de mitochondries par la digitonine 0,5 % dans le diméthyl-formamide incubation à 0°, 30 mn centrifugation 220 000 x g 20 mn

Particules mitochondriales — extrait surnageant

colonne 2,5 cm x 40 cm). L'élution avec ce même tampon, donne une fraction particulaire relativement homogène et ne contenant pas d'inhibiteurs. Ceux-ci peuvent également être éliminés par filtration des extraits bruts sur une colonne de Séphadex G-50, avant leur ultra-centrifugation.

Le culot de centrifugation à 220 000 x g constitue l'extrait particulaire total et le surnageant l'extrait surnageant.

C - Enfin, nous avons préparé des extraits enzymatiques en traitant directement dans une cellule de pression les suspensions de levures en tampon Tris 0,05 M, pH 7,7.

Cette dernière préparation est centrifugée à 8 000 x g pendant 12 minutes et le surnageant est traité comme indiqué plus haut (B), pour donner un extrait particulaire et un extrait surnageant.

5.- Mesure des activités respiratoires

L'activité respiratoire des suspensions de cellules ou de protoplastes a été déterminée par la méthode manométrique de Warburg, en mesurant les consommations d'oxygène dans les conditions suivantes : phase gazeuse : air ; température : 32° C ; substrat carboné : glucose 200 µM ; hydrocarbure ou alcool finement émulsionné par traitement aux ultra-sons (Kc. min.) ; tampon phosphate : 0,05 M pH 5,6 pour la suspension de cellules ou tampon phosphate-citrate 0,05 M pH 5,6 $MgSO_4$ (M). La suspension de cellules ou de protoplastes est ajoutée à raison de 1,5 à 2 mg (poids sec) par système.

6.- Mesure des activités enzymatiques

a) Hydrocarbure-déshydrogénase

L'activité déshydrogénasique à l'égard des hydrocarbures est déterminée en suivant spectrophotométriquement la réduction du NAD à 340 nm, à l'aide d'un spectrophotomètre Zeiss.

Le système expérimental (3 ml) dans une cuve Thunberg sous atmosphère d'azote ou d'air contient : NAD^+ : 7.10^{-3} M, n-décane : 18.10^{-3} M, extrait enzymatique : 1 à 5 mg de protéines.

Cette technique, basée sur la réduction du NAD au cours de la déshydrogénation du n-décane, permet de définir une activité enzymatique totale exprimée en nanomoles de NAD^+ réduit par minute. L'activité spécifique représente le nombre d'unités par mg de protéines dosées par la méthode de LOWRY et coll. (1951).

b) Alcool- et aldéhyde-déshydrogénases

L'activité déshydrogénasique à l'égard des alcools est déterminée à partir de la mesure de la réduction du NAD à 340 nm à l'aide d'un spectrophotomètre Zeiss. Le système expérimental (3 ml) contient du NAD 7.10^{-3} M et l'extrait enzymatique (de 0,8 à 1,2 mg de protéines). Le substrat étant insoluble dans l'eau est ajouté au système réactionnel à la concentration finale de 18.10^{-3} M soit sous forme d'une fine émulsion préparée par traitement aux ultra-sons d'un mélange d'alcool (5 % V/V) dans une solution aqueuse de Tween 80 à 0,5 % ou de désoxycholate de sodium 30 mM, soit sous forme d'une solution 0,05 M dans la diméthylformamide (LEBEAULT et coll., 1970d, 1970e).

L'activité aldéhyde-déshydrogénase est mesurée dans les mêmes conditions expérimentales.

Les deux activités sont exprimées en nanomoles de NAD réduit par minute et par mg de protéines dosées par la technique de LOWRY et coll., (1951).

c) Hydroxylation des acides gras et des alcanes

1/ Acide laurique

L'activité hydroxylase est mesurée par analyse quantitative des produits de la réaction formés à partir de 1-^{14}C laurate.

Le système réactionnel contient dans un volume final de 1 ml, 100 µ moles de tampon Tris-HCl pH 7,5, 0,5 µ mole de NADPH, 0,4 µ mole de laurate de potassium 1-C^{14} (6.10^5 cpm) et 1 à 2 mg de protéines.

Après incubation à 30° C pendant 15 minutes, la réaction est arrêtée par addition de 0,4 ml d'acide sulfurique à 10 %, le milieu réactionnel est extrait par 5 ml de mélange benzène-éther en parties égales et les produits de la réaction sont séparés par chromatographie sur colonne de silice (KUSUNOSE et coll., 1964).

2/ n-octane et n-décane

Le système réactionnel est le même que celui utilisé pour l'hydroxylation de l'acide laurique. Le substrat (1-^{14}C octane ou 1-^{14}C décane : 0,5 µmole dans 0,01 ml d'acétone, 8.10^4 cpm)et les produits d'oxydation sont séparés sur colonne d'alumine d'après la méthode de GHOLSON et coll. (1963) qui consiste à éluer l'excès de substrat par l'éther de pétrole, l'alcool formé par du méthanol, et l'acide par un mélange méthanol-acide acétique (4 : 1 , V/V).

3/ n-hexadécane

Le 1-^{14}C hexadécane dissous dans l'éthanol est introduit dans le milieu réactionnel précédemment décrit.

La réaction est arrêtée par 0,4 ml de H_2SO_4 à 10 % et le mélange réactionnel est extrait deux fois avec 5 ml de chloroforme. Après évaporation du solvant, les produits de la réaction sont méthylés par traitement avec une solution de boro-fluorure dans le méthanol. Les produits d'oxydation sont séparés par chromatographie en couche mince sur gel de silice. Les R_F de l'ester méthylique de l'acide palmitique et de l'hexadécanol sont respectivement de 0,61 et 0,19, la phase mobile est constituée par un mélange éther de pétrole, éther, acide acétique (40 : 10 : 1, V/V).

Enfin, les produits de la réaction sont élués à partir du gel de silice et leur radioactivité est mesurée dans un compteur à scintillation (Nuclear Chicago).

d) NADPH-cytochrome c réductase

Cette activité est mesurée par la méthode de MASTER et coll. (1967). Le milieu réactionnel (1 ml) contient 0,1 µmole de NADPH, 0,04 µmole de cytochrome c et 0,7 ml d'un tampon phosphate pH 7,7 contenant 10^{-4} M d'EDTA. La réduction du cytochrome c est suivie à 550 mµ à l'aide d'un spectrophotomètre Gilford.

7.- Recherche du cytochrome P_{450}

L'extrait préparé en tampon phosphate à pH 7,7 est réduit par addition d'hydrosulfite. On fait alors barbotter de l'oxyde de carbone

pendant 30 secondes dans la cuve de mesure, et le spectre différentiel est mesuré à l'aide d'un spectrophotomètre Cary modèle 14. La concentration en cytochrome P_{450} est calculée en prenant comme coefficient d'extinction moléculaire 91 cm^{-1} mM^{-1} pour la différence entre la densité optique mesurée à 450 nm et celle mesurée à 490 nm (OMURA et SATO, 1965).

8.- Analyse qualitative des produits des réactions enzymatiques

Après acidification, précipitation des protéines du mélange réactionnel par l'acide trichloracétique, et élimination des protéines par centrifugation, le surnageant est extrait par l'éther sulfurique. L'analyse qualitative des produits des différentes réactions enzymatiques est effectuée par chromatographie sur couche mince de gel de silice.

a) Séparation du mélange n-décane et 1-décène

La séparation de ces deux composés peut se faire sur plaque de gel de silice G, contenant 30 % en poids de nitrate d'argent, la phase mobile étant constituée par un mélange hexane-chloroforme (100 : 10, V/V). Les R_F pour le n-décane et le 1-décène, sont respectivement de 0,9 et 0,5. Les chromatogrammes sont révélés par une solution éthanolique de rhodamine 6G.

b) Séparation du mélange 1-décanol, décanal et acide décanoïque

Ces produits sont séparés par chromatographie sur gel de silice G en utilisant comme phase mobile un mélange hexane-éther-acide acétique (100 : 7 : 1, V/V). Les R_F pour le 1-décanol, décanal, et l' acide décanoïque sont respectivement 0,8, 0,5 et 0,3 en utilisant comme révélateur la 2',7'-dichlorofluorescéine.

c) Séparation du mélange n-décane, 1-décène, 1-décanol et 9-décène 1-ol

Ce mélange peut être séparé par chromatographie sur gel de silice G contenant 30 % en poids de nitrate d'argent d'après la méthode de MITCHELL et HÜBSCHER (1968), la phase mobile étant un mélange hexane-éther-acide acétique (160 : 40 : 4, V/V). Les R_F du n-décane, 1-décène, 1-décanol et de

9-décène.1-Ol sont respectivement : 0,18, 0,29, 0,43 et 0,55 (révélation par la rhodamine 6G).

d) Séparation du mélange 1-décanol, 9-décène.1-Ol, acide décanoïque

Les R_F de ces différents produits déterminés par chromatographie sur gel de silice G avec un mélange benzène-dioxane-acide acétique (180 : 50 : 8 V/V), sont respectivement de 0,52, 0,62 et 0,91. La révélation se fait avec la 2',7'-dichlorofluorescéine.

e) Séparation du mélange 1-10 décanediol acide 10-hydroxydécanoïque et acide décanedioïque

Les produits d'oxydation des α-ω-diols et en particulier du 1-10 décanediol sont séparés par chromatographie sur gel de silice avec un mélange benzène : dioxane : acide acétique (200 : 25 : 10, V/V), les R_F du 1-10 décanediol de l'ω-hydroxyacide et du diacide correspondants étant respectivement de 0,3, 0,37 et 0,43. On a également procédé à une chromatographie sur colonne (1 x 10 cm) d'alumine en milieu méthanol suivant la méthode décrite par KUSUNOSE et coll. (1964). Dans ces conditions le 1-10 décanediol est élué par le méthanol et la fraction acide par le mélange méthanol-acide acétique (3 : 1, V/V). La fraction acide analysée par chromatographie sur gel de silice présente une tache correspondant à l'acide ω-hydroxydécanoïque. L'oxydation par le permanganate conduit au diacide correspondant.

CHAPITRE III

OXYDATION DES ALCANES PAR LES CELLULES ET LES PROTOPLASTES DE *C. TROPICALIS*

Introduction

La préparation des protoplastes constitue pour les levures comme pour les bactéries, la première étape de la localisation des enzymes dans la cellule. Depuis les travaux d'EDDY et WILLIAMSON (1957) sur la digestion des parois de levures par le jus d'*Helix pomatia*, de nombreux auteurs ont cherché à remplacer cette source d'enzymes lytiques par des préparations bactériennes plus actives.

L'hélicase (Industrie Biologique Française) est le nom commercial d'une préparation lyophilisée de suc digestif d'*Helix pomatia*. C'est en fait un mélange d'enzymes, dont l'efficacité en tant qu'agent de solubilisation des parois de *Saccharomyces cerevisiae* a été longuement discutée par ANDERSON et MILLBANK (1966). L'activité 1.3 glucanase (TANAKA et PHAFF, 1965), qui semble être l'activité principale de ce mélange, voit son efficacité accrue par des activités enzymatiques complémentaires sur lesquelles on ne possède que peu de renseignements. De plus, suivant DAVIES et ELVIN (1964), la préincubation des levures en présence de thiols, donne des rendements en protoplastes meilleurs et plus reproductibles quelles que soient les conditions dans lesquelles les cellules ont été récoltées.

Sur des levures autre que *S. cerevisiae*, l'hélicase a donné des résultats décevants. AGUIRRE et VILLANUEVA (1965) et GASCON et coll. (1965) ont donc cherché à utiliser des enzymes lytiques produites par des souches de *Micromonospora* et de *Streptomyces*, et ont obtenu de bons résultats avec *Candida utilis*. De plus, NOVAES et VILLANUEVA (1963), ont utilisé l'action de la "strepzyme" système enzymatique libéré dans le milieu de culture par les *Streptomyces*, pour déterminer la composition chimique des parois de *C. utilis*. Il ressort de l'ensemble de ces travaux que la préparation des

protoplastes dépend de nombreux facteurs, et en particulier de la nature du substrat de croissance des levures et des conditions physiologiques de leur culture et de leur récolte.

Nous nous sommes proposés, de mettre au point une méthode adaptée à la préparation de protoplastes de *Candida tropicalis* cultivé sur hydrocarbures. Cette étude préliminaire nous a donné d'intéressantes informations sur les propriétés des cellules de *C. tropicalis* cultivées à partir des alcanes ou de leurs produits intermédiaires et nous a conduit à la technique de préparation des protoplastes décrite au Chapitre précédent.

1.- Etude sur les conditions de préparation des protoplastes de *C. tropicalis*

a) Traitement à l'hélicase

On a d'abord opéré suivant la méthode préconisée par KOVAC et coll. (1968) : Les cellules de levures, lavées et remises en suspension dans 20 ml de tampon Tris-HCl 0,1 M pH 9,3 (50 à 100 mg de cellules poids sec par ml) sont incubées pendant 30 minutes à 32° C en présence de thioglycollate de sodium (0,5 M), puis centrifugées. Les cellules sont lavées dans un tampon phosphate-citrate 0,01 M à pH 5,8 contenant du sorbitol 0,7 M, du mannitol 0,3 M et de l'EDTA 0,001 M puis remises en suspension dans 10 ml de la même solution. On ajoute 1 ml d'hélicase et le mélange est incubé à 30° C sous agitation. La cinétique de la formation des protoplastes est suivie spectrophotométriquement comme il a été dit.

Par la suite, on a utilisé les conditions qui sont décrites dans le Chapitre des Méthodes et qui diffèrent essentiellement des précédentes par l'addition au milieu de $MgSO_4$ 1,0 M, par la suppression de l'EDTA, et par un pH plus acide (4,1 au lieu de 5,8).

b) Traitement à la "strepzyme"

Les solutions actives sont obtenues à partir de cultures de *M. chalcea* et *S. violaceus* dans des milieux minéraux contenant des débris cellulaires de *C. tropicalis* comme seule source d'énergie et de carbone. Après 4 jours d'incubation, les cultures sont centrifugées à 12 000 x g pendant 20 minutes et le culot est éliminé. Le surnageant, traité par $(NH_4)_2SO_4$ à 80 %, est à nouveau centrifugé. Le précipité repris par un tampon phosphate-citrate 0,05 M à pH 5,8 contient suivant les préparations de 0,7 à 1 mg de protéines par ml et constitue notre préparation de "strepzyme".

Les protoplastes sont préparés comme précédemment décrit, en présence de $MgSO_4$ (M), mais en remplaçant l'hélicase par une solution de "strepzyme" à raison de 15 à 25 mg de protéines par ml de suspension cellulaire.

2.- Résultats de ces différentes méthodes

Le traitement à l'hélicase des cellules de *S. cerevisiae* dans les conditions expérimentales définies par KOVAC et coll. (1968), c'est-à-dire en milieu sorbitol-mannitol, donne des résultats qui dépendent en grande partie de la nature de la souche et des conditions physiologiques des cellules.

Les levures de *S. cerevisiae* souche *U* cultivées en aérobiose en présence de glucose, recueillies en phase exponentielle de croissance et soumises à ce traitement par l'hélicase sont rapidement converties en protoplastes (figure 11). Après 10 minutes de traitement, le rendement mesuré d'après la diminution de densité optique est de 60 pour cent, puis la vitesse de formation des protoplastes diminue lentement jusqu'à 50 minutes d'incubation, après quoi la densité optique ne varie plus. On peut considérer que la réaction est terminée. L'examen microscopique de la préparation montre que toutes les cellules ont été transformées en protoplastes.

Il convient de souligner qu'en fonction de l'âge et de la nature des lots commerciaux d'hélicase, la vitesse de formation des protoplastes est plus ou moins rapide.

Ce même traitement appliqué aux cellules de *C. tropicalis* cultivées sur glucose en aérobiose et recueillies en phase exponentielle de croissance donne des résultats négatifs. Il en est de même lorsque *C. tropicalis* est cultivé sur n-tétradécane (figure 12 courbe 2).

Par contre, en présence d'une forte concentration en magnésium, et à pH 4,1, l'hélicase convertit très rapidement et très efficacement en protoplastes les cellules de *C. tropicalis* cultivé sur n-tétradécane (figure 12, courbe 3).

On a vérifié que dans ces conditions la conversion des cellules en protoplastes est pratiquement complète et que les protoplastes obtenus sont entiers. Dans ce but, on a utilisé le fait que seules les cellules intactes et les protoplastes entiers sont capables de respirer en présence d'hydrocarbures, les particules subcellulaires et les extraits solubles n'ayant aucune activité respiratoire à l'égard de ces substrats.

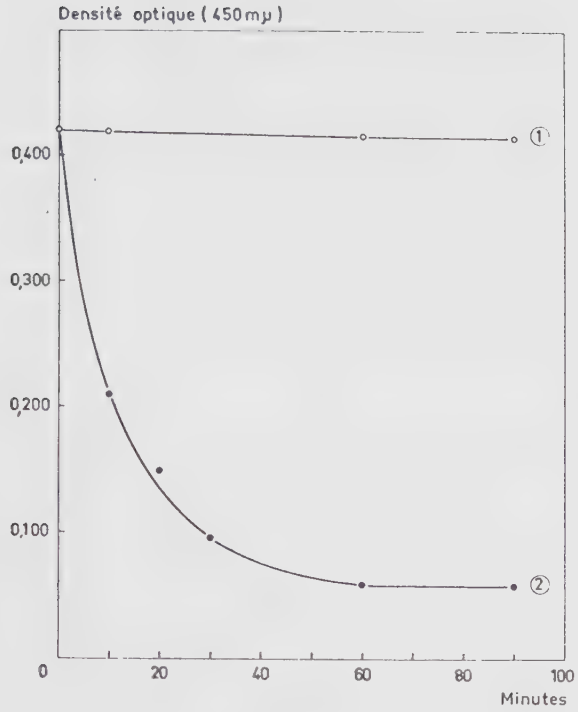


Figure 11 - Cinétique de formation des protoplastes en présence d'hélicase (2) dans une suspension de cellules de *S. cerevisiae* cultivée sur glucose. Courbe (1) système expérimental témoin sans hélicase.

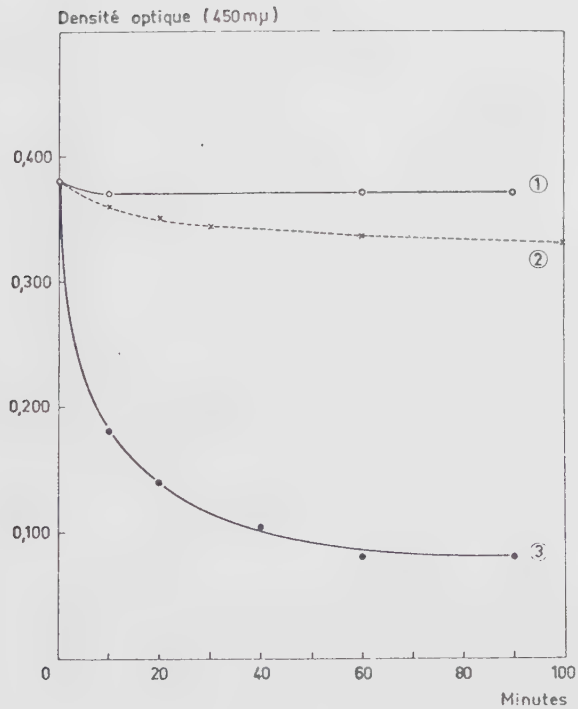


Figure 12 - Cinétique de formation des protoplastes en présence d'hélicase dans une suspension de cellules de *C. tropicalis* cultivées sur n-tétradécane.
(1) témoin ne contenant pas d'hélicase,
(2) en présence d'hélicase et en milieu sorbitol-mannitol à pH 5,8,
(3) en présence d'hélicase et de $MgSO_4$ 1 M à pH 4,1.

Lorsque les préparations obtenues par l'hélicase en milieu contenant $MgSO_4$ 1,0 M sont diluées de façon à faire éclater les protoplastes par choc osmotique, leur activité respiratoire en présence de n-tétradécane, devient nulle. Ceci démontre que avant leur dilution ces préparations contenaient exclusivement des protoplastes osmotiquement sensibles, et ne contenaient pas une proportion notable de cellules demeurées intactes. Ces observations concordent avec les résultats des examens microscopiques montrant que la morphologie des protoplastes formés par le traitement à l'hélicase est manifestement différente de celle des cellules intactes (figure 13).

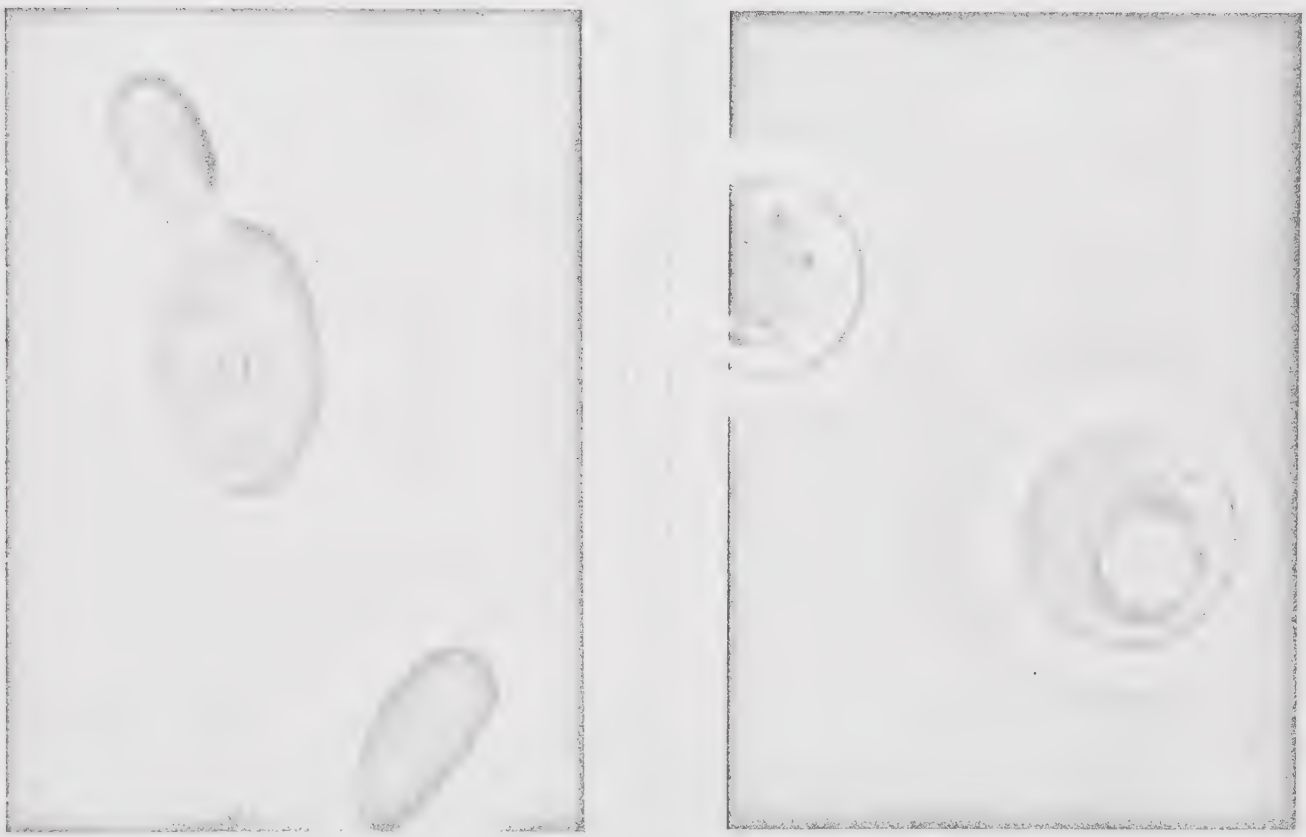


Figure 13 - Microphotographies des cellules de *C. tropicalis* (A) et des protoplastes préparés par action de l'hélicase (B).

3.- Préparation des protoplastes par action des "strepzymes"

Le traitement des cellules de *C. tropicalis* cultivées sur n-tétradécane par des solutions de "strepzyme" en présence de $MgSO_4$ 1,0 M

et à pH 4,1 permet également d'obtenir des protoplastes.

La figure 14 montre que la "strepzyme" de *Streptomyces violaceus* est plus active que celle de *Micromonospora chalcea* et que, d'autre part, dans les deux cas les activités ne sont accrues que très légèrement par l'addition de thioglycollate (figure 14, courbe 1 et 3).

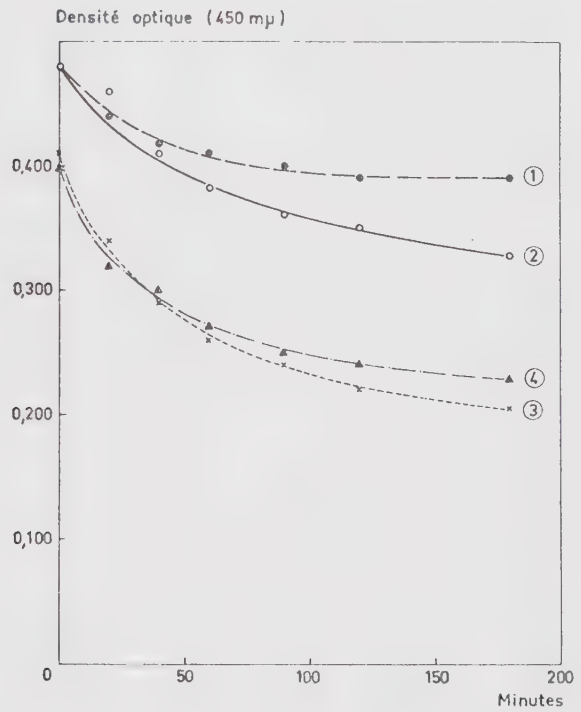


Figure 14 - Cinétique de formation des protoplastes en milieu $MgSO_4$ 1,0 M à pH 4,1 dans une suspension de cellules de *C. tropicalis* en présence de solution de "strepzymes" obtenues à partir de cultures soit de *Micromonospora chalcea* (courbe 1 après incubation en présence de thioglycollate 0,5 M ; courbe 2 sans thioglycollate) soit de *Streptomyces violaceus* (courbe 3 après incubation en présence de thioglycollate 0,5 M ; courbe 4 sans thioglycollate).

Il convient de souligner que nous n'avons pas cherché à améliorer les conditions de préparation des "strepzymes" d'origine bactérienne. Toutefois, il est évident qu'une purification de ces enzymes peut permettre ultérieurement d'obtenir des activités plus élevées et d'augmenter l'efficacité du procédé. Nous nous sommes bornés dans ce travail à montrer que l'activité de solubilisation des enzymes sur les parois de levure en milieu

$MgSO_4$ 1,0 M est aussi efficace avec les "strepzymes" qu'avec l'hélicase, dans le cas particulier de *Candida*.

4.- Activité respiratoire des protoplastes de *Candida tropicalis* cultivés sur n-tétradécane

Dans un récent travail VOLFOVA et coll. (1968) ont montré que contrairement aux cellules intactes les protoplastes de *Candida lipolytica* cultivé sur glucose ne sont pas capables d'oxyder l'hexadécane.

Cependant, nous avons effectué la même expérience avec nos préparations et nous avons constaté que les protoplastes de *C. tropicalis* cultivés sur n-tétradécane se comportent exactement comme les cellules intactes.

La figure 15 montre que les cellules de *C. tropicalis* oxydent le n-hexadécane, le n-tétradécane et le n-décane à la même vitesse et avec des

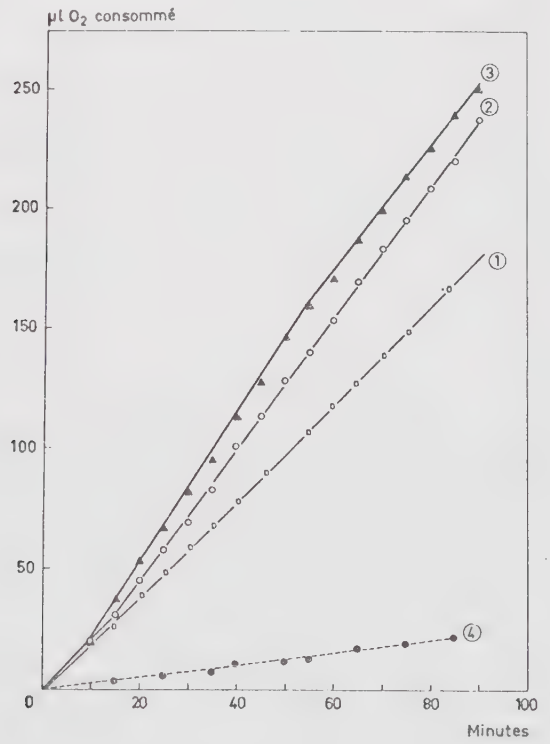


Figure 15 - Activité respiratoire des cellules de *C. tropicalis* (1,2 mg poids sec) cultivé sur n-tétradécane.
Substrats : (1) n-tetradécane, (2) n-décane, (3) glucose.

Q_{O_2} de l'ordre de 120 µl O_2 consommés par heure et par mg de cellules poids sec.

Par contre, en présence de n-octane, les valeurs des $-Q_{O_2}$ (25 µl) sont voisines de celles relevées sans substrat (17 µl (Tableau II). Ces

TABLEAU II - Activités respiratoires (µl d'O_2 consommés par mg poids sec et par heure) des cellules et des protoplastes de *C. tropicalis*

Conditions de croissance		Substrat		
		Alcanes		Glucose
		C_{14}	C_{10}	
Glucose :	cellules	84	88	75
	protoplastes	54	74	46
n-tétradécane :	cellules	120	130	97
	protoplastes	60	103	54

résultats sont en accord avec les observations d'AZOULAY et coll. (1965) suivant lesquelles les levures sont incapables de se développer à partir de n-paraffines de faibles poids moléculaires (n-pentane à n-nonane).

Les suspensions de protoplastes préparés par traitement à l'hélicase en milieu $MgSO_4$ 1,0 M donnent des résultats très semblables (figure 16). Les $-Q_{O_2}$ sont plus faibles que ceux mesurés avec les cellules intactes et sont très voisins pour le n-décane et le n-tétradécane soit respectivement 66 µl et 51 µl. Il convient de souligner que les protoplastes oxydent également le 1-décanol ($-Q_{O_2}$ = 38).

Les protoplastes de *C. tropicalis* cultivé sur n-tétradécane sont également capables d'oxyder le glucose ; après 40 minutes, on constate (figure 16, courbe 1) un accroissement de la vitesse d'oxydation, ce qui laisse supposer que les protoplastes comme les cellules intactes sont

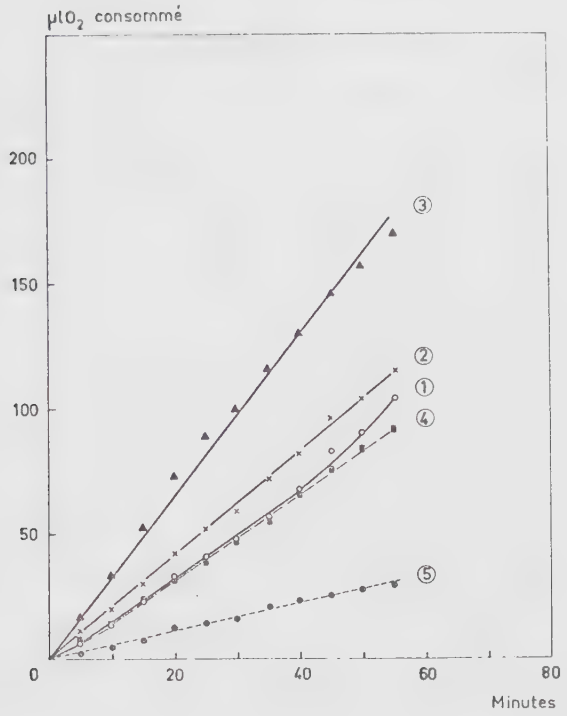


Figure 16 - Activité respiratoire des protoplastes obtenus à partir de cellules de *C. tropicalis* (1,6 mg poids sec) cultivé sur n-tétradécane.
Substrats : (1) glucose, (2) n-tétradécane, (3) n-décane, (4) 1-décanol, (5) respiration endogène.

susceptibles de s'adapter au glucose. Il est important de remarquer que ces déterminations ont été réalisées dans un milieu de forte pression osmotique de façon à éviter l'éclatement des protoplastes ; en effet le remplacement dans les systèmes expérimentaux du tampon phosphate-citrate plus $MgSO_4$ (M) par un tampon phosphate-citrate 0,005 M entraîne simultanément l'éclatement des protoplastes et la disparition de l'activité respiratoire, ce qui est en accord avec le fait déjà signalé que les extraits cellulaires de levure ne consomment pratiquement pas d'oxygène en présence d'hydrocarbures.

DISCUSSION

Les observations qui viennent d'être rapportées établissent que la possibilité d'utiliser l'hélicase pour obtenir des protoplastes est beaucoup plus générale qu'on aurait pu le penser d'après les données de la littérature, mais que les conditions expérimentales demandent à être choisies en fonction de chaque espèce de levure et pour une même espèce en fonction des conditions de culture. Notre méthode de préparation de protoplastes à partir de cellules de *C. tropicalis* est basée essentiellement sur le remplacement du mannitol et du sorbitol par $MgSO_4$ 1,0 M et par une incubation en milieu acide (pH 4,1). Dans ces conditions expérimentales, la vitesse de formation des protoplastes est identique pour *S. cerevisiae* et *C. tropicalis* et pour ce dernier organisme est la même que les cellules aient été cultivées sur glucose ou sur hydrocarbure.

Même en présence de magnésium et à pH acide, la conversion en protoplastes de *C. tropicalis* cultivé sur tétradécane nécessite une préincubation des cellules en présence de thioglycollate. Il semble que ce dernier traitement modifie la structure macromoléculaire de la paroi cellulaire de façon à la rendre plus accessible à l'hélicase. A l'appui de cette interprétation, nous avons constaté microscopiquement que, si des cellules de *C. tropicalis* cultivées sur tétradécane sont traitées par du thioglycollate, on constate une exsudation de l'hydrocarbure sous forme de gouttelettes nettement visibles. Ceci suggère que le thioglycollate est capable, sans doute par action sur des groupements -S-S-, de désadsorber des molécules d'hydrocarbures liées à la paroi de ces cellules.

Comme nous l'avons indiqué plus haut, les protoplastes de *C. tropicalis* se comportent à l'égard des hydrocarbures comme les cellules intactes, observation qui est en contradiction apparente avec les résultats de VOLFOVA et coll. (1968).

Cependant, il faut noter que ces auteurs ont préparé leurs protoplastes à partir de cellules cultivées sur glucose, et que ces protoplastes sont effectivement capables d'oxyder le glucose. Il est donc possible que la divergence entre les résultats de VOLFOVA et coll. et les nôtres puissent s'expliquer en supposant que les protoplastes de *C. lipolytica*, contrairement aux cellules entières sont incapables de s'adapter aux hydrocarbures.

Quoiqu'il en soit, ni les expériences de VOLFOVA et coll. ni les nôtres ne fournissent d'indications précises sur le rôle de la paroi dans le transfert des hydrocarbures dans les cellules.

Pour la préparation des protoplastes chez *C. tropicalis* cultivé sur n-tétradécane, on peut remplacer, comme l'avaient déjà indiqué GASCON et coll. (1965), l'hélicase par des "strepzymes" d'origine bactérienne. Il est intéressant de noter que dans ce dernier cas le pré-traitement des cellules par le thioglycollate est inutile.

CHAPITRE IV

DESHYDROGENATION DES ALCANES PAR DES EXTRAITS ACELLULAIRES DE *CANDIDA TROPICALIS*

Introduction

D'après les travaux antérieurs sur les mécanismes enzymatiques de la dégradation des alcanes par les micro-organismes, il existe au moins deux voies différant entre elles par l'attaque primaire du substrat ;

La première voie consiste dans une hydroxylation en présence de pyridine-nucléotides réduits, la seconde est un processus d'oxydation conduisant à l'alcool primaire par l'intermédiaire de l'alcène. Chez *Pseudomonas aeruginosa*, AZOULAY et SENEZ (1958) ont mis expérimentalement en évidence une déshydrogénation de l'heptane en présence de NAD et d'ATP, ce qui a conduit ces auteurs à proposer un mécanisme de déshydrogénation avec formation d'oléfine, laquelle serait ensuite oxydée en alcool primaire par un processus encore hypothétique, consistant dans la formation d'un époxyde et sa réduction ultérieure.

Nous nous sommes proposés d'étudier chez *C. tropicalis* la nature des différentes étapes enzymatiques impliquées dans la dégradation des alcanes et en particulier de rechercher chez cet organisme les deux modes d'attaque primaire qui viennent d'être mentionnées.

1.- Mise en évidence d'une activité alcane-déshydrogénase dans les préparations acellulaires de *C. tropicalis*

Les extraits préparés à partir des protoplastes ou de cellules entières réduisent le NAD en présence de n-décane. Il est important de souligner que cette réduction du NAD n'est possible que si le substrat a été préalablement émulsionné dans une solution aqueuse de Tween 80 à 0,5 %. Dans ces conditions, les seuls produits de la réaction ont été identifiés comme étant le 1-décanol et l'acide décanoïque. Bien que le 1-décène n'ait

pu être détecté, cette réduction du NAD dépendant du n-décane suggère fortement, par analogie avec les travaux d'AZOULAY et SENEZ une déshydrogénation du décane.

2.- Etude des propriétés enzymatiques

a) La déshydrogénation du n-décane n'est possible qu'en anaérobiose (figure 17, courbe 3) et en présence d'extrait débarrassé de ses inhibiteurs (figure 17, courbe 1) par filtration préalable sur Sépharose 2B (cf. Chapitre II).

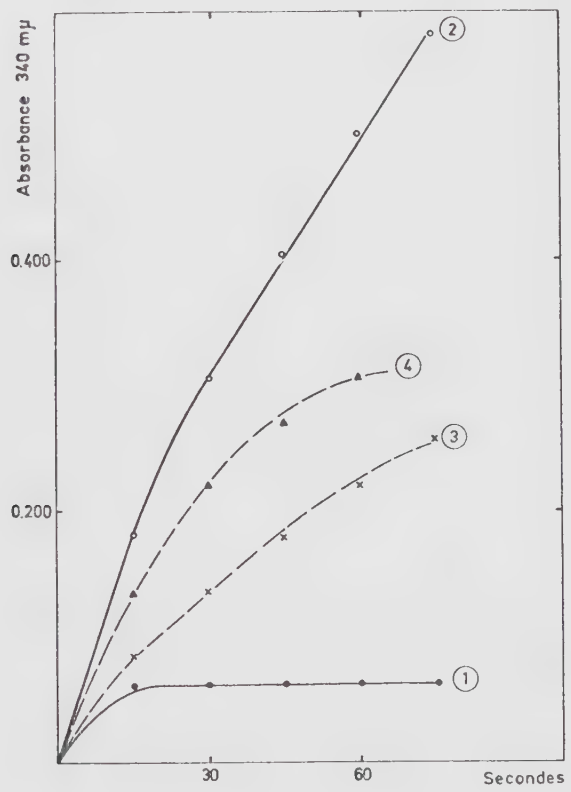


Figure 17 - Réduction du NAD en présence de n-décane. Le système réactionnel de 3 ml contient : 7.10^{-3} M de NAD^+, 18.10^{-3} M de n-décane et 0,8 mg de protéines.
- en aérobiose : (1) sans ATP ; (2) avec ATP 10^{-3} M.
- en anaérobiose : (3) sans ATP ; (4) avec ATP 10^{-3} M.

L'addition d'ATP 10^{-3} M dans les systèmes expérimentaux permet la déshydrogénation du n-décane en présence d'oxygène (figure 17, courbe 2).

Il convient de souligner que l'ATP ajouté dans les systèmes anaérobies à la même concentration est un activateur de la déshydrogénation (figure 17, courbe 4).

Les mitochondries entières et les préparations particulaires totales ne catalysent la déshydrogénation du n-décane qu'en présence de NAD. Aucune activité endogène n'est constatée en l'absence de NAD. Le NADP ne peut remplacer le NAD. Les extraits chauffés à 100° pendant 10 minutes sont totalement inactifs.

L'analyse des produits formés au cours de la réaction, après acidification et précipitation des protéines du milieu réactionnel et extraction à l'éther sulfurique, a été réalisée par chromatographie sur gel de silice en couche mince.

Nous avons vérifié qu'en aérobiose comme en anaérobiose la réaction conduit à la formation de 1-décanol et d'acide décanoïque. En l'absence de NAD exogène et après avoir préalablement passé l'extrait sur charbon actif pour le débarrasser complètement du NAD endogène, aucune transformation du n-décane n'est constatée.

Le remplacement du n-décane par le 1-décène dans nos systèmes expérimentaux ne permet de constater aucune réduction du NAD^+, mais conduit à la formation de 1-décanol et d'acide décanoïque.

En conclusion, les extraits mitochondriaux et particulaires de *C. tropicalis* catalysent une transformation du n-décane en décanol et acide décanoïque couplée avec la réduction du NAD^+. L'addition d'ATP accroît la vitesse de la réaction en anaérobiose. Elle est indispensable en aérobiose.

b) Lorsque les extraits ne sont pas soumis à une filtration préalable sur Sépharose 2B, on constate que l'activité spécifique augmente avec la concentration en protéines puis passe par un maximum et décroît notablement pour des valeurs de l'ordre de 15 mg de protéines par système (figure 18, courbe 1). Pour une concentration en protéines de 25 mg, l'activité n'est plus que de 30 % de l'activité maximum. Ces résultats indiquent que la filtration préalable a pour effet d'éliminer des inhibiteurs de nature non déterminée contenus dans les extraits bruts.

Cependant, même avec des extraits préalablement filtrés, on constate une chute importante de l'activité spécifique lorsque la quantité de protéines dans le système atteint et dépasse 0,8 mg. Cette inhibition est complètement supprimée par l'ATP dont l'addition maintient une proportionnalité constante entre l'activité enzymatique et la concentration en protéines (figure 18, courbe 2).

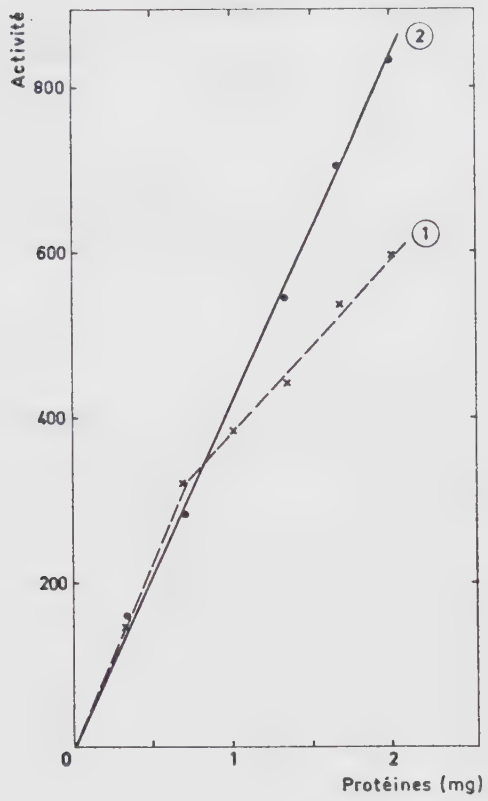


Figure 18 - Etude de l'activité alcane-déshydrogénase en fonction de la concentration en protéines. Systèmes contenant de l'ATP (10^{-3} M).
(1) extrait non purifié,
(2) extrait préalablement purifié par filtration sur Sépharose 2B.

c) pH optimum

Les extraits sont toujours préparés en tampon phosphate 0,05 M à pH 8,0, qui correspond à l'activité maximum. Dans ce tampon les extraits conservent leur activité pendant trois jours. Si on accroît la molarité du tampon phosphate, les extraits sont rapidement inactivés, de même que si on prépare les extraits en tampon Tris-HCl 0,05 M au même pH. Toutefois, si immédiatement avant son emploi l'extrait en tampon phosphate 0,05 M est repris par du tampon Tris-HCl, son activité est accrue de 10 à 20 pour cent.

d) Etude cinétique

Les constantes de Michaëlis apparentes et les vitesses maximum ont été déterminées en fonction de la concentration en n-décane (Tableau III, figure 19).

TABLEAU III - Influence de la concentration en n-décane sur l'activité n-décane déshydrogénase

Conditions expérimentales		K_m apparent	V_{max}
Anaérobiose	sans ATP	$4,5 \times 10^{-2}$ M	590
"	avec ATP 10^{-3} M	$4,5 \times 10^{-2}$ M	950
"	avec ac. lipoïque 10^{-3} M	$3,1 \times 10^{-2}$ M	390
Aérobiose	sans ATP	—	—
"	avec ATP 10^{-3} M	$3,5 \times 10^{-2}$ M	1080
	avec ac. lipoïque 10^{-3} M	$3,6 \times 10^{-2}$ M	250

V_{max} : nanomoles de NAD réduites par mg de protéines et par minute.

Les résultats obtenus précisent l'importance de l'ATP pour l'activité considérée et montrent que si, en anaérobiose, l'addition d'ATP ne modifie pas la valeur de K_m, elle a pour effet de multiplier V_{max} par un facteur voisin de deux.

Il convient de souligner qu'à la même concentration que l'ATP (10^{-3} M), l'acide lipoïque permet à la déshydrogénation du n-décane de s'opérer en aérobiose. Cependant, l'acide lipoïque ne modifie pas de façon significative l'affinité de la déshydrogénase pour son substrat. D'autre part, l'acide lipoïque exerce un certain effet inhibiteur comme le montre son influence sur V_{max}.

3.- Influence du degré d'émulsion du décane sur l'activité enzymatique

La cinétique de déshydrogénation du n-décane est directement liée au degré d'émulsion préalable de ce composé insoluble dans l'eau. Ce fait est

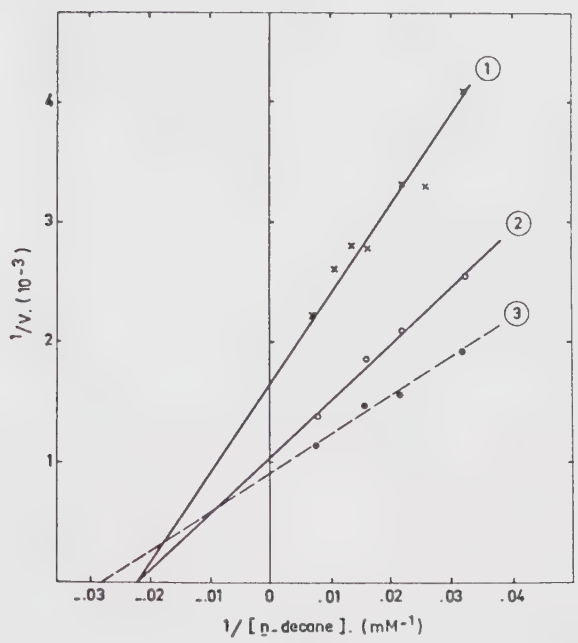


Figure 19 - Influence de la concentration en n-décane sur la vitesse initiale de déshydrogénation de ce substrat.
- en anaérobiose (1) sans ATP ; (2) avec ATP 10^{-3} M
- en aérobiose (3) avec ATP 10^{-3} M.
Représentation graphique suivant LINEWEAVER-BURK.

à rapprocher de ce qui avait déjà été constaté au cours de l'étude de l'heptanol-déshydrogénase de *Pseudomonas aeruginosa* cultivé sur hydrocarbure. De même, ROCHE et AZOULAY (1969) ont étudié la déshydrogénation de l'octanol par une souche de *Saccharomyces cerevisiae* "accoutumée" aux hydrocarbures, et ont observé que la vitesse initiale de ce processus dépend du degré d'émulsion du substrat. La figure 20 montre que la finesse de l'émulsion accroît l'affinité enzymatique, mais n'a pas d'influence sur V_{max}.

En ce qui concerne les hydrocarbures la nature de l'agent émulsifiant revêt une grande importance. Les émulsions de n-décane préparées en présence de Tween 80, sont hétérogènes et formées de grosses particules de diamètre supérieur à 2 µ. Le remplacement du Tween par le désoxycholate de

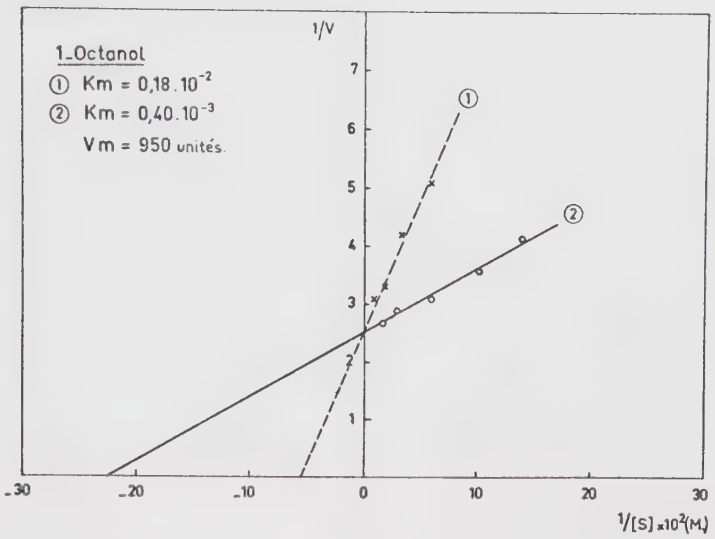


Figure 20 - Représentation graphique suivant la méthode de LINEWEAVER-BURK de la déshydrogénation du 1-octanol en fonction du degré d'émulsion du substrat.
Le 1-octanol est introduit dans le système sous forme d'émulsion particules de diamètre moyen 2,1 µ (1) et 0,3 µ (2).

---

sodium donne des émulsions plus fines (0,2 µ), homogènes et très stables, pour lesquelles l'activité déshydrogénasique est deux fois plus élevée qu'en présence d'émulsion contenant du Tween.

Pour préciser l'influence des agents émulsifiants, nous avons déterminé l'activité enzymatique en fonction de la concentration en désoxycholate. Ces expériences illustrées par la figure 21 ont montré que lorsque la concentration en détergent atteint 5.10^{-3} M, l'activité déshydrogénasique est brusquement et complètement inhibée. Cet effet inhibiteur des fortes concentrations en désoxycholate peut s'expliquer si on considère que nos extraits particulaires sont riches en phospho-lipides et que ceux-ci sont indispensables à l'activité enzymatique. En d'autres termes, on peut penser qu'au-dessus d'une certaine concentration le désoxycholate inhibe des enzymes de nature lipo-protéique.

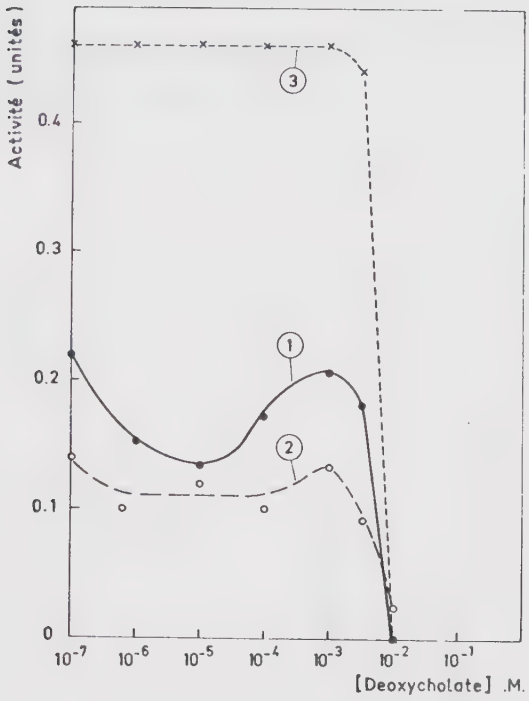


Figure 21 - Action du désoxycholate sur les trois activités alcane, alcool et aldéhyde-déshydrogénases.
Courbe (1) : hydrocarbure déshydrogénase, courbe (2) alcool-déshydrogénase, courbe (3) aldéhyde-déshydrogénase.

4.- Spécificité de substrat

La cinétique de la réaction dépendant du degré d'émulsion du substrat, il est évident que pour comparer les activités enzymatiques à l'égard des différents substrats ceux-ci devraient être émulsionnés de façon rigoureusement identique. Cependant, dans une première étape, nous avons simplement employé des émulsions obtenues dans des conditions standard de concentration et de temps d'émulsion.

a) Nature de l'alcane

L'activité spécifique des extraits particulaires est maximum à

l'égard du n-décane. Pour les autres hydrocarbures à chaîne droite de poids moléculaires plus petits, l'activité déshydrogénasique diminue et devient nulle pour l'hexane. Pour les hydrocarbures supérieurs à C_{10}, l'activité est inférieure à celle observée avec le décane, mais, elle reste appréciable jusqu'à l'hexadécane (figure 22).

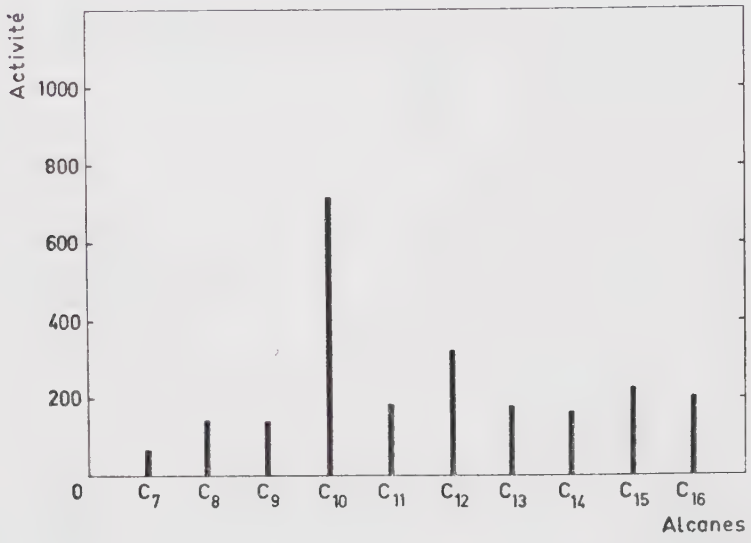


Figure 22 - Spécificité de substrat de l'alcane-déshydrogénase en fonction de la longueur de chaîne de l'alcane.

b) Action à l'égard des intermédiaires métaboliques

En présence de NAD, le 1-décène n'est pas déshydrogéné. Cependant en présence de NADH, c'est-à-dire du coenzyme réduit, celui-ci est très lentement réoxydé, ce qui permet de penser que la déshydrogénase agit réversiblement. Avec le 1.9-décadiène, le 5-décanol, l'acide décanoïque et ses homologues inférieurs, on ne constate aucune réduction du NAD.

Ces observations montrent que la déshydrogénation de la molécule hydrocarbonée ne peut se faire qu'au niveau d'un groupement méthyl-méthylène (CH_3-CH_2-). Nous reviendrons au cours de la discussion sur l'importance de ce fait.

5.- Influence de certains inhibiteurs

Le Tableau IV résume l'effet inhibiteur de différents composés sur l'activité alcane-déshydrogénase. Celle-ci est complètement inhibée par

TABLEAU IV - Effet inhibiteur de différents composés sur l'activité alcane-déshydrogénase

Inhibiteur	% d'inhibition
KCN	0
$HgCl_2$	100
Iodoacétate	20
β-mercaptoéthanol	10
$Na\ N_3$	10
KF	0
$MgCl_2$	28

Le système expérimental de 3 ml contient : n-décane $1,8.10^{-2}$ M, NAD^+ 7.10^{-3} M, inhibiteur 10^{-3} M.

$HgCl_2$ 10^{-3} M et à un degré moindre par l'iodo-acétate et par le chlorure de magnésium. Par contre, elle est insensible au cyanure de potassium et à l'azoture de sodium à concentration 10^{-3} M.

Il convient de souligner l'importance de l'inhibition provoquée par les acides gras et par les diacides à courte chaîne (Tableau V). En présence d'acide décanoïque $1,7.10^{-2}$ M, l'activité est inhibée de 60 % et les déterminations de K_i donnent des valeurs de l'ordre de 5.10^{-2} M. La figure 23 montre que cette inhibition est du type mixte.

Les acides gras étant des intermédiaires de la voie métabolique considérée, leur action inhibitrice peut être interprétée comme un mécanisme de régulation.

6.- Influence de la température

L'activité alcane-déshydrogénase est très thermosensible. En effet, l'incubation des extraits à une température de 40° C pendant 5',

TABLEAU V - Effet inhibiteur des acides gras sur l'activité alcane-déshydrogénase

Acide	% d'inhibition	
	$1,7.10^{-2}$ M	$5,1.10^{-2}$ M
C_2	0	10
C_3	0	30
C_5	9	13
C_7	13	49
C_8	4	100
C_9	64	100
C_{10}	64	100
C_{10} diacide	94	100

Le système expérimental de 3 ml contient : n-décane $1,8.10^{-2}$ M, NAD^+ 7.10^{-3} M, inhibiteur $1,7.10^{-2}$ M ou $5,1.10^{-2}$ M.

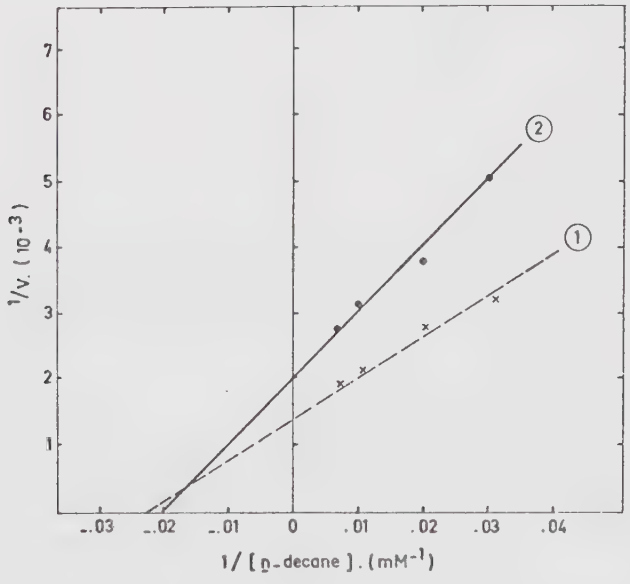


Figure 23 - Représentation graphique suivant la méthode de LINEWEAVER-BURK de la réduction du NAD, en présence de NAD^+ 7.10^{-3} M avec ou sans acide décanoïque 10^{-3} M.
(1) sans acide ; (2) avec acide.

entraîne une perte d'activité de 60 %.

Les cinétiques d'inactivation thermique ont été relevées à trois températures et pour des temps de chauffage allant de 5 à 20 minutes (figure 24).

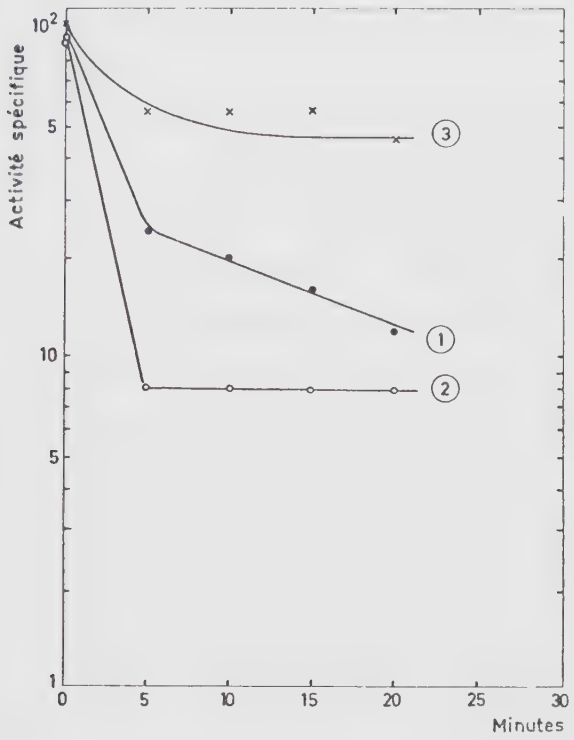


Figure 24 - Cinétique d'inactivation thermique à 40° C des trois activités alcane, alcool et aldéhyde-déshydrogénases.
(1) alcane-déshydrogénase ; (2) alcool-déshydrogénase ;
(3) aldéhyde-déshydrogénase

A 40° C, le temps de demi-vie de l'alcane déshydrogénase est de 3 minutes seulement. Il est possible que cette grande thermosensibilité soit liée à la localisation sub-cellulaire de l'enzyme.

CONCLUSIONS

Il résulte de nos observations que les préparations acellulaires de *C. tropicalis* catalysent la réduction du NAD en présence d'alcane. Cette activité est toujours liée à d'autres activités enzymatiques conduisant à la formation de décanol et d'acide décanoïque. Les faits les plus significatifs sont que l'enzyme est toujours associée à la cytochrome-oxydase, et qu'elle est localisée dans les mitochondries et très probablement dans les membranes mitochondriales.

Comme cela avait déjà été signalé pour l'alcane-déshydrogénase de *Pseudomonas aeruginosa*, mesurée en présence d'oxygène, l'activité enzymatique de *C. tropicalis* est ATP-dépendante et en présence d'ATP atteint des vitesses de l'ordre de 1 000 unités. Il convient de souligner que la déshydrogénation s'effectue également en l'absence d'oxygène, avec ou sans addition d'ATP, et conduit à la formation d'alcool, les vitesses relevées dans ces conditions étant respectivement de 900 unités et 600 unités.

Nous avons déjà souligné que dans toutes les conditions expérimentales le produit de la réaction est toujours l'alcool primaire et qu'il ne nous a pas été possible de mettre en évidence la formation d'oléfine. Toutefois, ce résultat négatif n'en exclut pas la possibilité. En effet, le groupe d'enzymes responsable de la dégradation des hydrocarbures étant de nature particulaire constitue probablement un complexe "multienzymatique" dont les constituants, comme c'est habituellement le cas, ne peuvent être séparés et isolés. Il est donc possible que l'oléfine soit formée par déshydrogénation de l'alcane mais immédiatement transformée en alcool par les enzymes associées à la déshydrogénase. Cette interprétation concorde avec le fait que les mêmes préparations particulaires convertissent l'oléfine en alcool.

Une constatation particulièrement intéressante est le fait que dans le cas de *C. tropicalis* les préparations particulaires convertissent l'alcane en alcool primaire aussi bien en anaérobiose qu'en aérobiose. Ce fait s'oppose à ce qui a été observé avec les bactéries. En anaérobiose, en effet, l'oxydation du n-heptane par *Pseudomonas aeruginosa* s'arrête à l'oléfine, qui s'accumule (AZOULAY et SENEZ, 1961). On peut donc penser que chez *C. tropicalis* la conversion en alcool de l'oléfine, si celle-ci est effectivement produite, s'opère par un processus anaérobie, c'est-à-dire par fixation d'une molécule d'eau, et non pas par un processus d'oxygénation.

La spécificité étroite de l'alcane déshydrogénase à l'égard de ses substrats indique que son activité s'exerce uniquement sur un groupement méthyl-méthylène CH_3-CH_2- appartenant à une molécule non polaire. C'est ainsi que le 1-décène, le 5-décanol et l'acide décanoïque ne sont pas déshydrogénés.

De plus, il faut signaler que l'analyse par chromatographie des produits formés au cours de l'action de l'extrait particulaire sur le 1-décène, en présence de NAD ou NADH, ou sans ces coenzymes, conduit toujours à la formation de 1-décanol, et non de 9-décène-1-Ol. Ce résultat est un autre argument en faveur de la formation intermédiaire de l'oléfine au cours de l'oxydation de l'alcane en alcool.

CHAPITRE V

HYDROXYLATION DES ACIDES GRAS ET DES ALCANES PAR *C. TROPICALIS*

Dans le chapitre précédent, nous avons montré que les préparations acellulaires de *C. tropicalis* réduisent le NAD en présence de n-décane. DUVNJAK (1970) a récemment montré que cette espèce de levure accumule dans les milieux de culture sur alcane des diacides ayant six à huit atomes de carbone. On peut penser que la formation de ces composés résulte d'une voie métabolique où intervient une hydroxylation des acides monocarboxyliques. Cette voie est déjà connue chez les mammifères. Cependant, les observations publiées sur ce dernier système montrent que les hydroxylases des animaux supérieurs ont une large spécificité et peuvent agir sur différents substrats comme les hydrocarbures aliphatiques, isoparaffiniques, cycliques et certains produits pharmaceutiques.

Nous avons donc recherché si *C.tropicalis* possède un système hydroxylase agissant sur les alcanes et sur leurs intermédiaires métaboliques.

1.- Mise en évidence d'une activité hydroxylase

Des extraits acellulaires de *C. tropicalis* cultivé sur n-tétradécane et récolté en phase exponentielle de culture ont été préparés par traitement dans une cellule de pression des cellules mises en suspension dans un tampon Tris-HCl 0,05 M à pH 7,7, contenant 30 % de glycérol. Ces extraits catalysent, en présence d'oxygène moléculaire et de NADPH la transformation de l'acide laurique en acide 12-hydroxylaurique et en acide dodécanedioïque(LEBEAULT et coll., 1971).

Afin de mieux localiser cette activité enzymatique dans les différentes fractions subcellulaires, nous avons préparé d'autres extraits en l'absence de glycérol. On constate en ce cas que 75 % de l'activité se

retrouve dans la fraction particulaire obtenue par centrifugation à 105 000 x g pendant 90 minutes. Cependant, dans l'état actuel de nos expériences, nous ne pouvons préciser si ces particules actives sont d'origine mitochondriale, comme nous l'avons montré dans le cas de l'activité alcane-déshydrogénase.

2.- Propriétés du système enzymatique

a) L'hydroxylation des acides gras ou des alcanes ne s'effectue qu'en aérobiose. Cette réaction est spécifique pour le NADPH (Tableau VI).

TABLEAU VI

Système réactionnel	Activité (%)
a) En aérobiose :	
- complet	100
- sans NADPH	9
- NADPH remplacé par NADP	9
- NADPH remplacé par NADH	8
- NADPH remplacé par NAD	6
b) En anaérobiose :	
- complet	5
- sans NADPH	4
- NADPH remplacé par NADP	4
- NADPH remplacé par NADH	5
- NADPH remplacé par NAD	7

Le système réactionnel complet contient dans un volume final de 1 ml, 100 µ moles de tampon Tris-HCl pH 7,5 ; 0,5 µ mole de NADPH; 0,4 µ mole de laurate 1^{14}-C ($6,0.10^5$ cpm) et l'extrait enzymatique 2,1 mg de protéine.

Toutefois avec ces extraits non purifiés, l'activité en présence de NADH, de NAD ou de NADP n'est pas nulle, mais elle ne dépasse pas 5 à 10 % de celle mesurée en présence de NADPH.

b) En présence d'acide laurique 0,4 à 1 µmole, la vitesse de formation d'acide 12-hydroxylaurique et d'acide dodécanedioïque est linéaire en fonction du temps pendant environ 15 minutes (figure 25) ; la vitesse initiale est

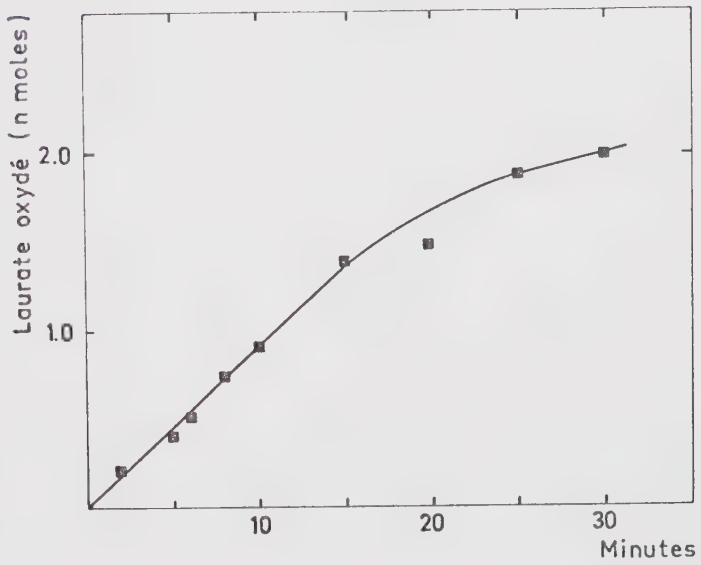


Figure 25 - Hydroxylation de l'acide laurique. Le système expérimental contient 100 µ moles de tampon Tris-HCl pH 7,5, 0,4 µ mole de laurate de potassium et 0,6 mg de protéines.

d'autre part proportionnelle à la concentration en protéines (figure 26). Aucune activité catalytique n'est observée avec des extraits chauffés à 100° pendant 10 minutes.

En fonction du pH (figure 27), l'activité hydroxylase présente un optimum à pH 7,5 en tampon Tris-HCl 0,1 M ; en tampon phosphate 0,1 M on retrouve le même pH optimum, mais la courbe est plus étalée.

c) La spécificité de substrat est résumée sur le Tableau VII. En ce qui concerne les acides gras l'activité spécifique est maximum pour l'acide laurique, et atteint 3,1 nanomoles d'acide laurique oxydé par minute et par mg de protéine, dont 2,48 nanomoles sont transformés en acide 12-hydroxylaurique et 0,63 nanomole en acide dodécanedioïque.

L'activité mesurée avec les alcanes est maximum avec l'hexadécane puis décroît avec la longueur de chaîne.

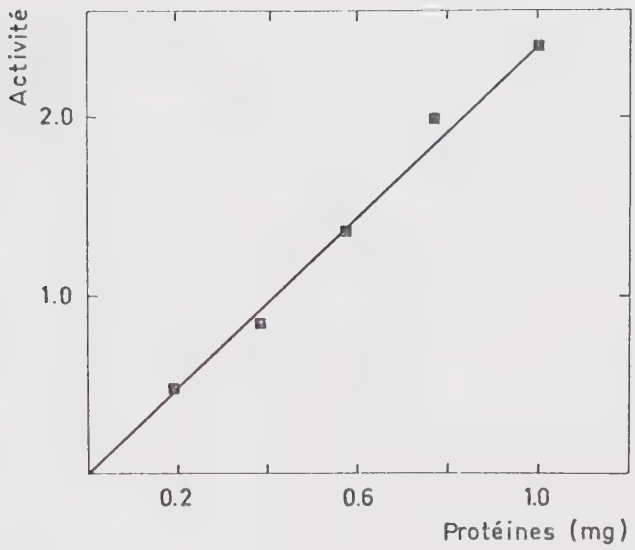


Figure 26 - Hydroxylation de l'acide laurique en fonction de la concentration en protéines. Les systèmes expérimentaux contiennent 100 µ moles de tampon Tris-HCl pH 7,5, 0,4 µ mole de NADPH, 0,4 µ mole de laurate de potassium et différentes quantités de protéines.

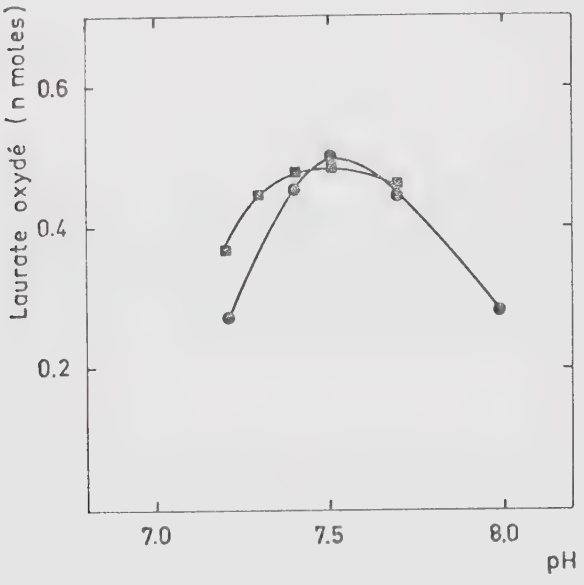


Figure 27 - Hydroxylation de l'acide laurique en fonction du pH; ●-● tampon Tris-Hcl ; ■-■ tampon phosphate. Les systèmes expérimentaux contiennent 0,4 µ mole de laurate de potassium, dans un volume final de 1 ml.

TABLEAU VII - Spécificité de substrat

Substrat	Concentration	Activité spécifique
	M	
Laurate	$5,0 \times 10^{-4}$	3,1
Myristate	$5,0 \times 10^{-4}$	2,8
Undecanoate	$5,0 \times 10^{-4}$	2,3
Decanoate	$5,0 \times 10^{-3}$	2,2
Palmitate	$5,0 \times 10^{-4}$	1,2
Stearate	$5,0 \times 10^{-4}$	0,9
Octanoate	$5,0 \times 10^{-2}$	0,8
Hexanoate	$2,5 \times 10^{-2}$	0,5
Hexadécane	$5,0 \times 10^{-4}$	0,8
Décane	$5,0 \times 10^{-4}$	0,2
Octane	$5,0 \times 10^{-4}$	0,2
Aminopyrine	4×10^{-3}	0,9
Benzphétamine	5×10^{-4}	0,5
Hexobarbital	5×10^{-3}	0,5
Ethylmorphine	1×10^{-3}	0,2

Le système réactionnel complet contient dans un volume final de 1 ml, 100 µ moles de tampon Tris-HCl pH 7,5 ; 0,5 µ mole de NADPH, 0,4 µ mole de laurate 1 ^{14}C ($6,0.10^5$ cpm) et 2,1 mg de protéines. L'activité spécifique est exprimée en nanomoles de substrat oxydé par minute et par mg de protéine.

Il est important de souligner l'activité à l'égard de l'aminopyrine, de l'hexobarbital et de l'éthylmorphine. Les constantes de Michaëlis apparentes ont été déterminées pour les acides laurique et décanoïque. Leurs valeurs sont égales respectivement à $3,5.10^{-5}$ M et $1,7\ 10^{-5}$ M et $1,7.10^{-4}$ M (figures 28 et 29). La vitesse maximum est égale à 4,4 unités pour l'acide laurique et à 2,9 unités pour l'acide décanoïque. Ces valeurs sont très voisines de celles qui ont été calculées par LU et coll. (1969) pour le système hydroxylase isolé à partir des microsomes du foie.

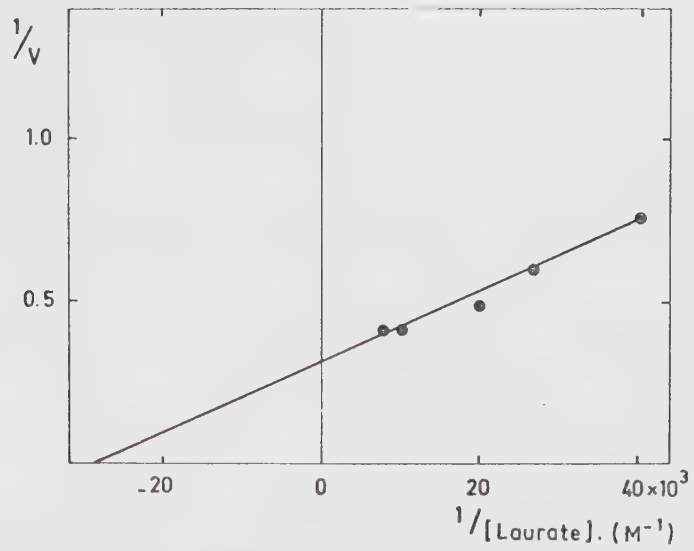


Figure 28 - Influence de la concentration en substrat sur la vitesse initiale d'hydroxylation de l'acide laurique. Représentation graphique suivant la méthode de Lineweaver-Burk.

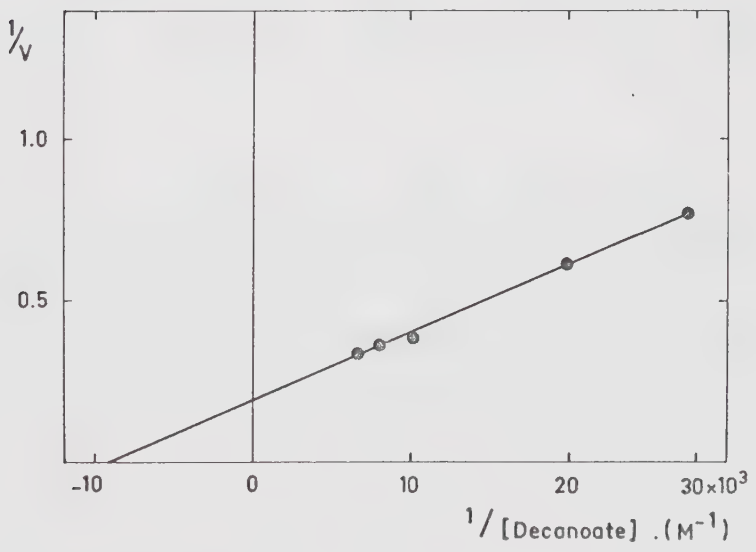


Figure 29 - Influence de la concentration en substrat sur la vitesse initiale d'hydroxylation de l'acide décanoïque. Représentation graphique suivant la méthode de Lineweaver-Burk.

d) L'influence de différents inhibiteurs a été étudiée dans le but de comparer cette activité hydroxylase avec celle d'autres systèmes déjà connus. Le système hydroxylase isolé à partir des microsomes du foie ou des surrénales est insensible à KCN et très sensible à l'oxyde de carbone. Par contre, le système hydroxylase de *P. oleovorans* est insensible à l'oxyde de carbone et sensible au KCN. Dans le premier cas, le cytochrome P_{450} intervient dans la réaction d'hydroxylation, alors que la rubrédoxine intervient dans le deuxième cas. Les Tableaux VIII et IX montrent que dans notre cas l'activité

TABLEAU VIII - Action inhibitrice de l'oxyde de carbone sur l'activité hydroxylase

Phase gaseuse	Activité
Air	100
N_2	5
$CO + O_2$ (1 : 2)	56
$CO + O_2$ (1 : 1)	33

Le système réactionnel complet contient dans un volume final de 1 ml : 100 µmoles de tampon Tris-HCl, 0,5 µmole de TPNH, 0,4 µmole de laurate 1-^{14}C ($6,0.10^{-5}$ cpm) et l'extrait enzymatique 1,6 mg de protéines.

est insensible au KCN et très fortement inhibée par l'oxyde de carbone. Ce système est donc à rapprocher du système hydroxylase des mammifères. D'autre part, le cytochrome c inhibe la réaction d'environ 50 % à la concentration de 10^{-3} M. Chez les mammifères, ce même comportement a été observé et interprété comme une compétition pour les électrons entre le cytochrome c et le cytochrome P_{450}.

3.- Analyse du système enzymatique

Par analogie avec le système hydroxylase des bactéries et plus particulièrement avec celui des mammifères, nous avons cherché à fractionner ce système afin de vérifier si le cytochrome P_{450} mis en évidence chez les mammifères et certaines bactéries, existe chez *C. tropicalis* et s'il intervient au cours de la réaction, comme le suggère d'ailleurs le fait déjà

TABLEAU IX - Influence de différents inhibiteurs sur l'activité hydroxylase

Inhibiteur	Concentration	Inhibition (%)
$CuCl_2$	1.10^{-3}	70
$CuCl_2$	5.10^{-4}	45
$HgCl_2$	1.10^{-3}	100
$HgCl_2$	5.10^{-4}	100
PCMB	1.10^{-3}	45
PCMB	5.10^{-4}	30
NaN_3	1.10^{-3}	40
NaN_3	5.10^{-4}	20
KCN	1.10^{-3}	0
KCN	5.10^{-4}	0
Na_2AsO_3	1.10^{-3}	0
Na_2AsO_3	5.10^{-4}	0
EDTA	1.10^{-3}	0
EDTA	5.10^{-4}	0
Cytochrome c	1.10^{-3}	50

Le système réactionnel complet contient dans un volume final de 1 ml : 100 µmoles de tampon Tris-HCl, 0,5 µmole de NADPH, 0,4 µmole de laurate 1-^{14}C (6.10^5 cpm) et 1,6 mg de protéines.

signalé, que l'activité est inhibée par CO.

a) Mise en évidence du cytochrome P_{450}

L'extrait brut préparé à partir de cellules de *C. tropicalis* cultivées sur alcane, présente le spectre du cytochrome P_{450} (figure 30) caractérisé par OMURA et SATO (1964), mais on peut noter que le contenu en cytochrome P_{450} est faible de l'ordre de 0,05 nanomoles par mg de protéine.

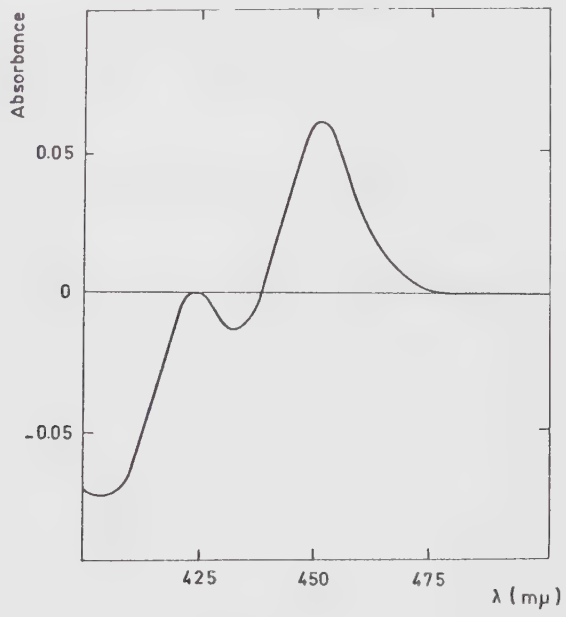


Figure 30 - Spectre différentiel du cytochrome P_{450}. La préparation contenant 13,4 mg de protéines par ml est réduite par addition d'hydrosulfite, la mesure est effectuée après barbottage de l'oxyde de carbone pendant 30 secondes dans la cuve de mesure et le spectre différentiel est enregistré sur un spectrophotomètre Cary 14.

b) Ces mêmes extraits possèdent l'activité NADPH-cytochrome c-réductase, qui a été mise en évidence avec du cytochrome c de coeur de cheval. L'activité spécifique de l'extrait brut est de 175 nanomoles de cytochrome c réduit, par minute et par mg de protéines.

c) Fractionnement

Par précipitation au sulfate d'ammonium en milieu glycérol à 6 % et en tampon Tris-HCl, pH 7,7, le cytochrome P_{450} précipite entre 0 et 40 %

de la saturation alors que l'activité NADPH-cytochrome c réductase ne précipite qu'au-dessus de 40 %.

Cependant, chacune de ces deux fractions possède encore une faible activité hydroxylase, ce qui est dû à une séparation incomplète du système. Nous avons donc préparé dans les mêmes conditions une fraction A précipitée entre 0-35 % de $(NH_4)_2SO_4$ et une fraction B précipitée entre 45 et 80 %, en écartant la fraction intermédiaire. Dans ces conditions, les activités des deux fractions prises isolément sont nulles, et l'activité redevient importante si l'on mélange les fractions A et B, lesquelles contiennent respectivement le cytochrome P_{450} et la NADPH-cytochrome c-réductase.

Nous avons vu par ailleurs que la fraction A peut être remplacée par le cytochrome P_{450} purifié à partir des microsomes du foie (Tableau X)

TABLEAU X - Résolution du système hydroxylase

Fractions	Protéines par système	Activité cpm
A (0-40 %) $(NH_4)_2 SO_4$	0,3	1 047
B (45-80 %) $(NH_4)_2 SO_4$	0,2	300
A + B	0,3 + 0,1	2 718
	0,3 + 0,2	3 200
	0,5 + 0,2	4 872
B + P_{450} (1)	0,3 + 0,23	3 326
P^{*}_{450}	0,23	200
A + Réductase (2)	0,30 + 0,08	1 320
	0,30 + 0,16	1 550
	0,30 + 0,32	2 950

Fraction A ou cytochrome P_{450}. Fraction B NADPH-cytochrome c réductase.

1) Cytochrome P_{450} isolé à partir des microsomes du foie (0,6 µM par mg de protéines).
2) NADPH-cytochrome c-réductase isolée à partir des microsomes du foie (activité spécifique 9 : exprimée en nanomoles de cytochrome c réduit par minute et par mg de protéines).

et que la fraction B peut être remplacée par la NADPH cytochrome c-réductase isolée et purifiée à partir de ces mêmes microsomes.

o

o o

CONCLUSIONS

Les observations qui viennent d'être rapportées montrent que *C. tropicalis* cultivé sur hydrocarbure possède une hydroxylase analogue à celle qui a été mise en évidence dans les microsomes hépatiques des mammifères. Le fait que le cytochrome P_{450} ou la NADPH-cytochrome c-réductase isolés à partir du foie peuvent remplacer la fraction A ou la fraction B provenant de *C. tropicalis* montre d'une part que ces deux composantes sont nécessaires dans l'expression de l'activité enzymatique et que d'autre part elles doivent être identiques ou très semblables. De plus, les deux systèmes ont des propriétés enzymatiques voisines, notamment en ce qui concerne la spécificité de substrat. Ces résultats posent le problème du rôle physiologique de cette enzyme chez cette levure. En effet, il semble que l'enzyme agisse préférentiellement sur les acides gras, pour conduire à la formation de diacides, ce qui est en accord avec la présence d'une activité diacyl-CoA synthétase spécifique des diacides supérieurs (AZOULAY et DUVNJAK, 1971). En outre, l'activité hydroxylase peut assurer la transformation de l'alcane en alcool, mais on peut se demander quelles sont, au point de vue physiologique, les parts respectives de ce système et du système déshydrogénase dans le métabolisme des paraffines.

CHAPITRE VI

ALCOOL ET ALDEHYDE DESHYDROGENASES DE *CANDIDA TROPICALIS* CULTIVE SUR HYDROCARBURE

Introduction

L'étude du métabolisme dégradatif des hydrocarbures chez les micro-organismes a conduit à proposer un schéma qui comporte une transformation de l'alcane en alcool, puis en aldéhyde. Dans le cas particulier de *P. aeruginosa*, l'existence d'alcool et d'aldéhyde déshydrogénases a été démontrée. (AZOULAY et HEYDEMAN, 1963 ; HEYDEMAN et AZOULAY, 1963 ; BAPTIST et coll., 1963 ; VAN DER LINDEN et HUYBREGTSE, 1963). Ces auteurs ont par ailleurs montré l'importance de ces enzymes dans le métabolisme des alcanes.

En ce qui concerne les levures, il a été établi que *Saccharomyces cerevisiae* "accoutumé" aux hydrocarbures possède une alcool-déshydrogénase de nature soluble, qui est spécifiquement induite par les hydrocarbures. D'autre part, il a été constaté que les extraits acellulaires de *Candida tropicalis* cultivé sur n-tétradécane catalysent la transformation de cet alcane en acide gras correspondant et que deux enzymes sont impliquées dans ce processus, une alcool- et une aldéhyde-déshydrogénases. L'étude préliminaire de ce système (LEBEAULT et coll., 1970) a permis de constater que ces activités sont localisées dans des particules d'origine mitochondriale.

Nous nous proposons dans ce chapitre de préciser la nature de ces enzymes.

1.- Distribution de l'activité alcool-déshydrogénase particulaire de *C. tropicalis*

Les extraits particulaires de *C. tropicalis* cultivé sur n-tétradécane et récolté en phase exponentielle catalysent la réduction du NAD en présence de 1-décanol. Le NADP, le 2.6-dichloro-indophénol ou le ferricyanure ne peuvent en aucun cas remplacer le NAD.

L'activité spécifique mesurée dans ces conditions est fonction de nombreux paramètres et en particulier du degré d'émulsion du substrat et de la stabilité de cette émulsion en fonction du temps. Sa valeur, mesurée dans les premières 30 sec., peut varier entre 250 et 600 unités.

Des essais préliminaires de localisation enzymatique ont été réalisés sur différentes fractions séparées par centrifugation différentielle des extraits bruts (Tableau XI).Après centrifugation à 220 000 x g, pendant 90 minutes les fractions particulaires se divisent en deux couches superposées que l'on peut aisément séparer et qui constituent les fractions P_3 et P'_3 du Tableau. La couche inférieure (P_3) est fortement colorée en rouge. Les particules qui la composent ont une forte activité cytochrome oxydase et plus de 70 pour cent de l'activité alcool-déshydrogénase initiale. Ce dernier fait est à rapprocher de ce que nous avions déjà rapporté dans une précédente publication (LEBEAULT et coll., 1970). Nous avions établi à l'aide d'une technique de préparation de protoplastes (LEBEAULT et coll., 1969) et de séparation de mitochondries, que plus de 80 % de l'activité alcool-déshydrogénase est localisée dans les mitochondries. La couche supérieure (P'_3) est floconneuse et moins colorée. Elle ne contient que 9 pour cent de l'activité alcool-déshydrogénase.

L'analyse qualitative des produits de la réaction d'oxydation du 1-décanol par la fraction P_3 permet de mettre en évidence l'acide décanoïque et des traces d'aldéhyde décyclique. Ces résultats s'expliquent par le fait que ces mêmes extraits particulaires possèdent également une activité aldéhyde-déshydrogénase responsable de l'oxydation de l'aldéhyde formé par l'oxydation de l'alcool (Tableau XI).

2.-Oxydation des alcools supérieurs par les extraits particulaires de *C. tropicalis*

La fraction particulaire P_3 de *C. tropicalis* n'a aucune activité NAD réductase en l'absence de substrat. En présence de 1-décanol, son activité est proportionnelle à la concentration en protéines, et liée à l'état physique du substrat, ce qui confirme les observations antérieures de ROCHE et AZOULAY (1963) avec *S. cerevisiae*.

A ce dernier égard nous avons comparé les activités à l'égard de 1-décanol émulsifié par le Tween 80 (0,5 %) ou par le désoxycholate (10^{-3} M) et dissous dans la diméthyl-formamide. Dans les trois cas, les valeurs

TABLEAU XI - Distribution des activités alcool-déshydrogénase et aldéhyde-déshydrogénase dans les extraits acellulaires de *C. tropicalis* cultivé sur n-tétradécane

Fraction		Activité alcool-déshydrogénase		Activité aldéhyde-déshydrogénase	
		Activité spécifique*	Activité récupérée %	Activité spécifique*	Activité récupérée %
Centrifugation à 500 x g	S_1	164	100	200	100
Centrifugation à 5 000 x g	S_2	346	120	418	120
Centrifugation à 220 000 x g	S_3	102	14	38	11
	P_3	418	71	496	60
	P'_3	128	9	208	14

*Activité spécifique exprimée en nanomoles de NAD réduit par minute et par mg de protéines.
S : surnageants ; P : fractions particulaires (voir le texte).

extrapolées de V_{max} sont identiques, mais les Km apparents diffèrent de manière très marquée, leurs valeurs étant respectivement 31 mM, 7 mM et 0,7 mM avec le Tween 80, le désoxycholate et la diméthyl-formamide (figure 31).

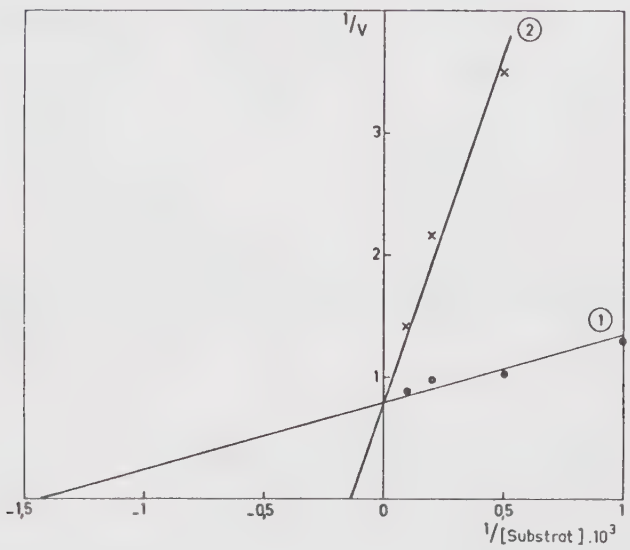


Figure 31 - Influence de la concentration et du degré de dispersion du 1-décanol sur la vitesse initiale d'oxydation de ce substrat. Représentation graphique de LINEWEAVER-BURK. Le 1-décanol est introduit dans le mélange réactionnel soit sous forme de solution dans la diméthylformamide (1) soit émulsionné par le désoxycholate (2).

Ces observations nous ont conduit à employer systématiquement, pour comparer les activités, les mono-alcools ou les α-ω diols en solution dans la dimethylformamide. En ce qui concerne les diols, il convient d'ailleurs de souligner que ces composés ne peuvent être émulsionnés par le Tween.

La spécificité à l'égard de la position occupée par la fonction alcool dans la chaîne carbonée est illustrée par le Tableau XII. On voit que le 2-décanol est oxydé moins vite que l'alcool primaire et que le 5-décanol ne l'est plus. Il est remarquable que le 9-décène-1-Ol et le 1-10 décanediol sont aussi rapidement oxydés que l'alcool primaire. Nous avons, d'autre part, comparé les vitesses d'oxydation des différents alcools

TABLEAU XII - Activité alcool-déshydrogénase à l'égard des différents alcools des extraits particulaires de *C. tropicalis* cultivé sur n-tétradécane

Substrat	Activité spécifique*
1-décanol	1 250
2-décanol	820
5-décanol	20
9-décène-1-01	1 200
1-10-décanediol	1 050

*exprimée en nmoles de NAD réduit par minute et par mg de protéines.

primaires aliphatiques, en présence de NAD et d'extrait particulaire. Nos observations, illustrées par la figure 32, montrent que les extraits particulaires oxydent les alcools de C_6 à C_{16} avec des activités spécifiques

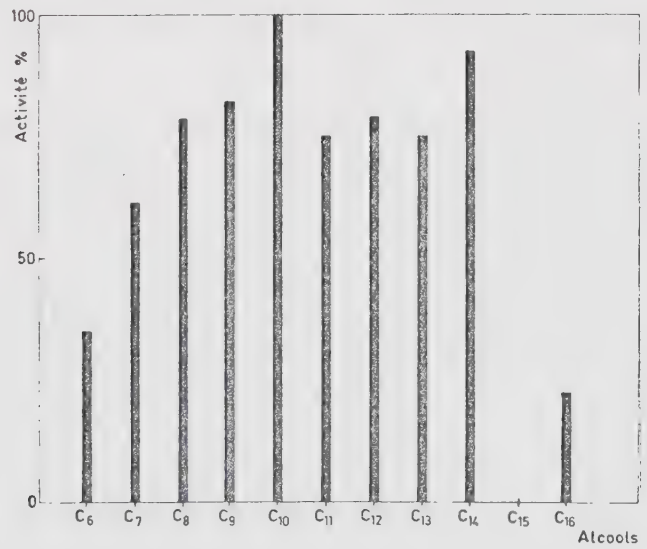


Figure 32 - Influence de la longueur de chaîne des alcools primaires sur l'oxydation de ces alcools. Activités exprimées en % de l'activité spécifique mesurée avec le 1-décanol - système standard : 1 mg de protéines particulaires, substrat 18.10^{-3} M et NAD 7.10^{-3} M (Le substrat a été préalablement dissout dans la diméthylformamide.

relativement faibles pour l'hexanol et l'hexadécanol et très voisines pour les alcools intermédiaires. Il est important de souligner que l'éthanol et les autres alcools à nombre d'atomes de carbone inférieur à 6 ne sont pas oxydés.

Les figures 33 et 34 montrent les K_m apparents et V_{max} relevés pour la série des alcools de C_6 à C_{14}. On constate que, lorsque la longueur de la chaîne augmente, V_{max} augmente mais que l'affinité apparente de l'enzyme pour le substrat diminue. Par contre, dans le cas des α-ω diols, V_{max} et l'affinité augmentent avec la longueur de la molécule. C'est ainsi que, pour le 1.8 octanediol, on relève K_m = 2,1 mM et V_{max} = 830, et pour le 1.12-dodécanediol K_m = 1,9 mM et V_{max} = 1150.

3.- Autres propriétés de l'alcool-déshydrogénase particulaire de *C. tropicalis*

En fonction du pH, l'activité enzymatique présente un optimum, à pH 9,3 aussi bien en tampon Tris-HCl 0,05 M qu'en tampon glycine-NaOH 0,05 M. Nous n'avons constaté aucune activation ni inhibition en remplaçant le tampon Tris-HCl par un tampon pyrophosphate de sodium de mêmes molarité et pH.

Une incubation à 40° C pendant 5 minutes entraîne une perte d'activité de 80 % et la même durée d'incubation à 45° C provoque une inactivation totale. L'action des inhibiteurs, résumée sur le Tableau XIII est particulièrement marquée pour le KCN et le NaN_3. Ce comportement rapproche notre enzyme de l'éthanol-déshydrogénase classique et le différencie de celle de l'enzyme particulaire de *S. cerevisiae* qui est actif à l'égard des alcools supérieurs. En ce qui concerne les métaux, leur effet inhibiteur est dans l'ordre décroissant $Fe^{++} > Cu^{++} > Mg^{++}$. Les mesures d'inhibition effectuées, en présence de 1.10-décanediol ou de 1-décanol comme substrat donnent les mêmes résultats.

Il convient de souligner l'inhibition par l'acide décanoïque qui, à concentration 10^{-3} M, réduit l'activité de 20 à 25 %. Ce comportement est à rapprocher de celui de l'alcane-déshydrogénase de la même levure.

4.- Etude de l'activité aldéhyde-déshydrogénase des extraits particulaires

Nous avons montré que le 1-décanol en présence d'extrait

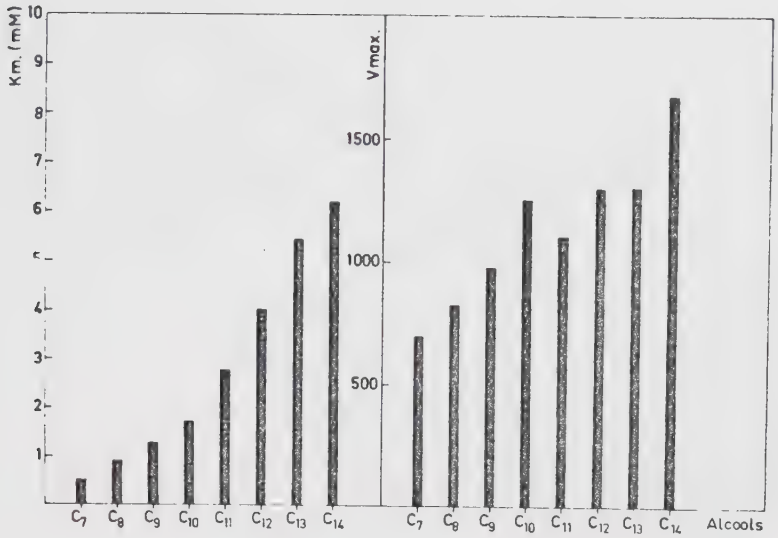


Figure 33 - Influence de la longueur de chaîne des alcools primaires sur les K_m et V_{max} de ces substrats.

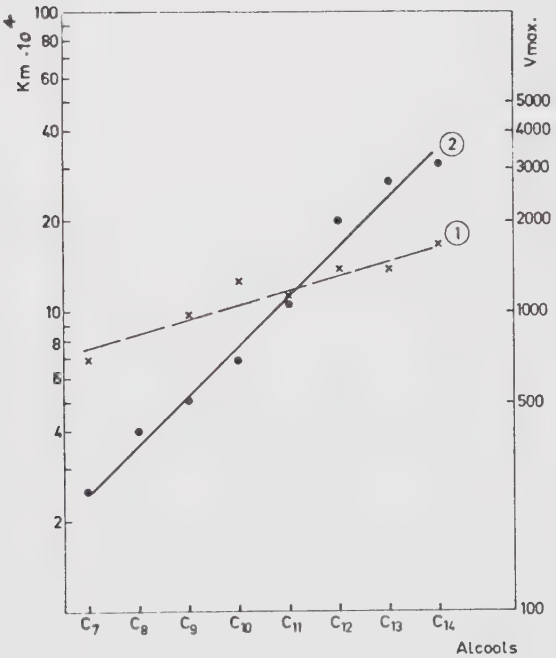


Figure 34 - Variation de K_m (2) et V_{max} (1) en fonction de la longueur de chaîne des alcools (Coordonnées semi-logarithmiques).

TABLEAU XIII - Influence de différents inhibiteurs sur l'activité alcool-déshydrogénase mesurée à l'égard du 1-décanol et du 1.10-décanediol, et sur l'activité aldéhyde-déshydrogénase mesurée à l'égard du décanal.

Inhibiteurs mM	Inhibition (%)		
	Alcool-déshydrogénase		Aldéhyde-déshydrogénase
	1-décanol	1.10-décanediol	décanol
Iodoacétate de sodium	44	37	-
Hydroxylamine	32	32	100
Ethylmaléimide	83	81	75
Cystéine	50	54	-
$HgCl_2$	100	100	100
PCMB	100	100	100
KCN	62	65	51
NaN_3	33	31	24
Cu^{++}	50	54	32
Fe^{++}	84	82	35
Mg^{++}	35	38	32
Ca^{++}	30	30	35
β-mercapto-éthanol	-	-	10

particulaire et de NAD est transformé en acide décanoïque. La même expérience réalisée avec, comme substrat, l'aldéhyde décylique en solution dans la diméthylformamide conduit aussi à la formation d'acide décanoïque. Les extraits particulaires peuvent donc catalyser l'oxydation des aldéhydes en présence de NAD. Une étude comparative sur la localisation de cette activité nous a permis de constater qu'elle est fortement liée à l'activité alcool-déshydrogénase, et comme précédemment (Tableau XI) 74 % de l'activité totale de l'extrait se retrouve dans la fraction particulaire P_3.

Le NAD ne peut être remplacé ni par le NADP ni par les colorants. La constante de Michaëlis apparente à l'égard du NAD est $K_m = 0,8.10^{-3}$ M.

Pour une quantité fixe d'extrait enzymatique, l'activité déshydrogénasique croît en fonction de la concentration en substrat et aucune inhibition par excès de substrat n'est observée avec cette enzyme, à la différence de ce qui a été constaté pour l'aldéhyde-déshydrogénase de *Pseudomonas aeruginosa* (HEYDEMAN et AZOULAY, 1963). L'activité spécifique est ici encore fonction du degré d'émulsion du substrat. Les valeurs de K_m diffèrent en fonction du degré de dispersion du substrat. Elles varient entre 24 mM (Tween 80) et 0,06 mM (diméthylformamide), V_{max} étant dans tous les cas de 2 120 unités pour le décanal. L'activité à l'égard de divers aldéhydes est illustrée par la figure 35. D'autre part, si on porte

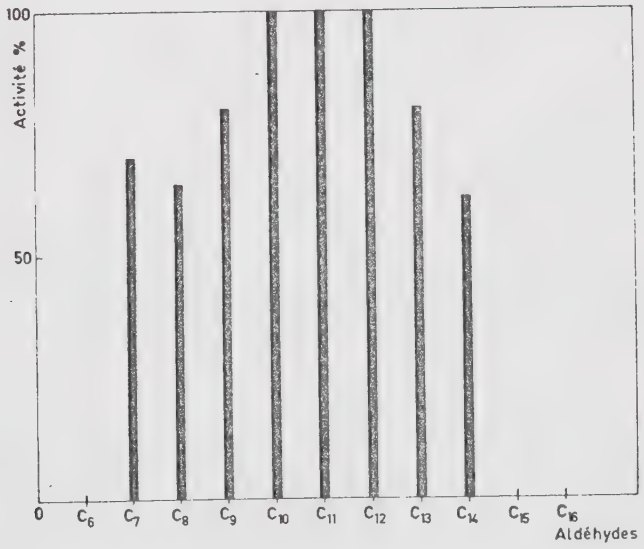


Figure 35 - Activité déshydrogénasique des extraits acellulaires de *C. tropicalis* à l'égard de différents aldéhydes. L'activité est exprimée en % de celle mesurée avec le décanal.

graphiquement K_m et V_{max} en fonction de la longueur de chaîne du substrat (figure 36), on retrouve le même phénomène que celui déjà décrit pour l'alcool-déshydrogénase. L'examen de cette figure met en évidence une variation exponentielle des valeurs des K_m et V_{max} en fonction du nombre d'atomes de carbone du substrat et montre qu'à un K_m peu efficace correspond un V_{max} élevé. Dans les conditions décrites les aldéhydes inférieurs ne sont pas déshydrogénés.

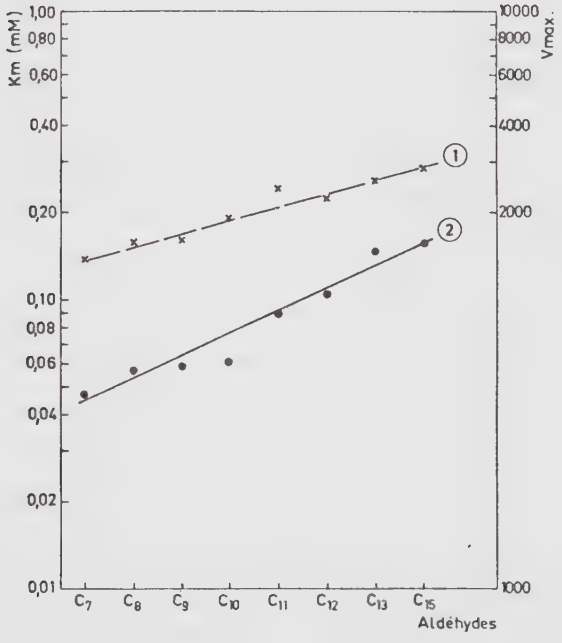


Figure 36 - Variation des K_m (2) et V_{max} (1) en fonction de la longueur de chaîne des aldéhydes (Coordonnées semi-logarithmiques).

En fonction du pH, l'activité aldéhyde-déshydrogénase de *C. tropicalis* présente un optimum en tampon Tris-HCl 0,05 M à pH 8,5 ; l'activité mesurée en tampon glycine-NaOH 0,05 M pH 8,5 est légèrement inférieure. Le pH optimum est légèrement inférieur à celui déterminé pour l'alcool-déshydrogénase.

L'aldéhyde-déshydrogénase est relativement moins thermo-sensible que l'alcool-déshydrogénase. Cinq minutes d'incubation à 40° et 30 minutes

à 45° C ne déterminent que 30 % et 90 % d'inactivation, respectivement.

L'action des inhibiteurs (Tableau XIII) présente de nombreuses analogies avec ce qui a été rapporté précédemment pour l'alcool-déshydrogénase. Il convient cependant de souligner qu'à la différence de l'alcane-déshydrogénase et de l'alcool-déshydrogénase, l'aldéhyde-déshydrogénase est insensible aux acides gras. Il faut enfin noter que le β-mercaptoéthanol est très faiblement inhibiteur.

5.- Essais de séparation des activités alcool- et aldéhyde-déshydrogénases particulaires de *C. tropicalis*

L'association de deux activités enzymatiques dans la même fraction particulaire nous a incité à entreprendre des essais de solubilisation de ces particules en présence de désoxycholate, ou de digitonine dissoute dans la diméthylformamide. Ces traitements se sont révélés inefficaces et ont conduit à la perte des deux activités alcool- et aldéhyde-déshysdrogénases.

Des essais de séparation ont été effectués, d'autre part, en soumettant la fraction P_3 à une ultracentrifugation dans un gradient linéaire de concentration en saccharose (20 % à 80 %, P : V), suivant la technique de AMES et coll. (1961) modifiée par AZOULAY et PUIG (1968). Ces essais ont été réalisés dans les conditions suivantes : 0,5 ml d'extrait particulaire P_3 contenant 15 mg de protéines par ml est placé sur 4,5 ml de gradient de saccharose et centrifugé pendant 5 heures dans un rotor SW 39 L à 39 000 rpm (figure 37). Dans ces conditions, l'activité aldéhyde-déshydrogénase se répartit en deux fractions particulaires de densités différentes, alors que l'alcool-déshydrogénase se dissocie en une fraction particulaire et une autre de nature soluble. Cette dernière représente environ 1 à 5 % des protéines totales. Elle provient probablement d'une légère solubilisation des particules, mais il n'est cependant pas exclu qu'elle corresponde à une alcool-déshydrogénase distincte, comme cela a été mis en évidence chez *S. cerevisiae* (ROCHE et AZOULAY, 1969).

6.- Mise en évidence d'une alcool-déshydrogénase soluble

On vient de voir que les particules P_3 obtenues par centrifugation à 220 000 x g possèdent des activités alcool- et aldéhyde-déshydrogénases

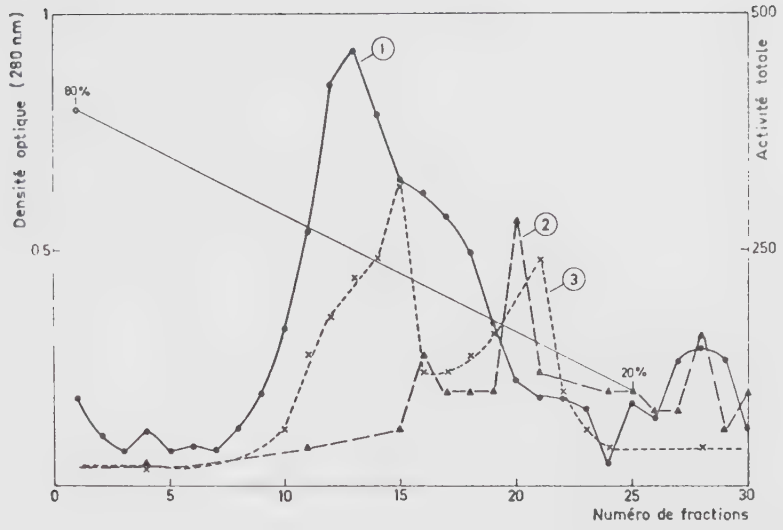


Figure 37 - Profil de sédimentation sur gradient de concentration linéaire de 20 à 80 % en saccharose d'un extrait particulaire de *C. tropicalis* cultivée sur n-tétradécane. Sur les fractions recueillies après 5 heures de centrifugation à 170 000 x g, on a déterminé les concentrations en protéines (courbe 1), l'activité alcool-déshydrogénase (courbe 2) et l'activité aldéhyde-déshydrogénase (courbe 3). Les unités d'activités sont définies dans le Chapitre des Méthodes.

---

dont les propriétés ont été décrites. Le surnageant (S_3) de cette même centrifugation est également actif à l'égard des alcools et des aldéhydes (Tableau XI). Les activités déshydrogénasiques de la fraction soluble sont masquées par le fait que les préparations considérées réduisent très activement le NAD même en l'absence d'alcool. Cependant, cette activité "endogène" peut être complètement éliminée par passage sur une colonne de Séphadex G-10. Les extraits ainsi traités ne réduisent le NAD qu'en présence d'un mono alcool (1-décanol) ou du diol correspondant (1.10-décanediol) ou encore de l'aldéhyde (décanal). Dans ces conditions, le 1-décanol est converti, comme dans le cas des extraits particulaires, en décanal et en acide décanoïque qui ont été identifiés par chromatographie sur gel de silice. D'autre part, le 1.10-décanediol conduit à la formation de l'ω-hydroxy-acide correspondant.

Il convenait de se demander si ces activités déshydrogénasiques solubles correspondent à une solubilisation partielle des enzymes particu-

laires, où si elles sont dues à des enzymes distinctes, d'origine cytoplasmique.

En effet, le fait que chez divers micro-organismes les alcanes et leurs intermédiaires métaboliques sont métabolisés par des systèmes enzymatiques multiples a été signalé par plusieurs auteurs. C'est ainsi que *Pseudomonas aeruginosa* possède à la fois une alcool-déshydrogénase NAD-dépendante, de nature constitutive, et une alcool-déshydrogénase induite par les alcanes et ne paraissant pas être liée aux pyridine-nucléotides (VAN DER LINDEN et HUYBREGSTE, 1969). De même chez la levure *Saccharomyces cerevisiae*, on a mis en évidence deux déshydrogénases actives sur les alcools supérieurs, l'une particulaire (LEBEAULT et coll., 1970), l'autre soluble et probablement cytoplasmique (ROCHE et AZOULAY, 1969).

En ce qui concerne *C. tropicalis*, un premier argument, suggérant que l'activité de la fraction soluble est liée à une enzyme distincte, et de nature probablement cytoplasmique, est le fait que, si on prépare des mitochondries intactes par choc osmotique de protoplastes, le surnageant obtenu par centrifugation à 15 000 x g possède une activité alcool-déshydrogénase aussi importante que celle obtenue dans la fraction S_3 des extraits totaux préparés avec une cellule de pression.

D'autre part, on s'est efforcé de purifier l'activité alcool-déshydrogénase soluble, afin de comparer ses propriétés à celles des préparations particulaires (P_3).

Cette purification a été réalisée dans les conditions suivantes :

Le surnageant S_3, obtenu par centrifugation à 220 000 x g est filtré sur une colonne (40 x 2 cm) de Sephadex G-10 équilibrée avec un tampon Tris-HCl 0,05 M pH 7,7. Les fractions actives exclues sont réunies et appliquées sur une colonne (3 x 15 cm) de DEAE cellulose équilibrée avec le même tampon. L'élution est réalisée par un gradient linéaire de NaCl (0 à 0,8 M) en tampon Tris-HCl 0,05 M pH 7,7. Les fractions actives éluées entre 0,20 et 0,22 M NaCl sont réunies et précipitées par $(NH_4)_2SO_4$ à 80 % de saturation. Le précipité obtenu est redissous dans 5 ml de tampon Tris-HCl 0,05 M pH 7,7, puis filtré sur une colonne (2,5 x 70 cm) de Sephadex G-200 équilibrée avec le même tampon. L'activité enzymatique est éluée dans la première fraction suivant le volume d'exclusion.

L'examen du Tableau XIV montre que l'alcool-déshydrogénase est purifiée environ 30 fois avec un rendement de l'ordre de 20 %. Il est important de noter que tout au long de la purification, le rapport des activités mesurées en présence de 1-décanol et de 1.10-décanediol reste constant.

TABLEAU XIV - Purification de l'alcool-déshydrogénase

Fractions	Activité spécifique*	Activité totale	Rendement %	$\frac{A_{S_1}}{A_{S_2}}$
Sephadex G-10	82	108 000	100	1,69
DEAE-cellulose (après précipitation par $(NH_4)_2SO_4$ à 80 %)	1 530	38 000	35	1,58
Sephadex G-200	2 340	22 000	20	1,64

*L'activité spécifique est exprimée en nanomoles de NAD réduit par minute et par mg de protéines.

**A_{S_1} activité spécifique à l'égard du 1-décanol.

***A_{S_2} activité spécifique à l'égard du 1.10-décanediol.

D'autre part, les préparations obtenues sont dépourvues d'activité aldéhyde-déshydrogénase, celle-ci étant éliminée au cours du passage sur DEAE-cellulose.

7.- Etude cinétique de l'alcool-déshydrogénase soluble

L'enzyme purifiée catalyse l'oxydation du 1-décanol et du 1.10-décanediol en présence de NAD. La valeur du K_m apparent à l'égard de ce coenzyme est 0,4 mM.

Le K_m relevé avec décanol (0,24 mM) est sensiblement inférieur à celui obtenu dans le cas de l'enzyme particulaire (0,65 mM), ce qui correspond à une plus grande efficacité. A l'égard du même substrat, la valeur de V_{max} (1 750) est plus élevée que celle de l'enzyme particulaire.

Cependant les différences majeures entre les deux types d'enzymes, sont que, contrairement à l'alcool-déshydrogénase particulaire, l'affinité et la vitesse maximum de l'enzyme soluble augmentent l'une et l'autre avec le poids moléculaire des mono-alcools, et que l'enzyme soluble est plus efficace pour les alcools primaires que pour les diols correspondants. (Tableau XV).

TABLEAU XV - Détermination des K_m et V_{max} de l'alcool-déshydrogénase soluble pour les alcools primaires et les diols

Substrat	K_m (mM)	V_{max}
1-décanol	0,24	1 750
1-dodécanol	0,15	1 850
1-tétradécanol	0,12	2 125
1.10-décanediol	0,86	860
1.11-undécanediol	0,72	940
1.12-dodécanediol	0,60	1 120

En outre, dans le cas des mono-alcools, l'enzyme soluble est inhibée par un excès de substrat (figure 38) et cette inhibition est d'autant plus marquée que la chaîne carbonée est plus longue (figure 39).

Avec les diols, on ne constate aucune inhibition par excès de substrat (figure 40).

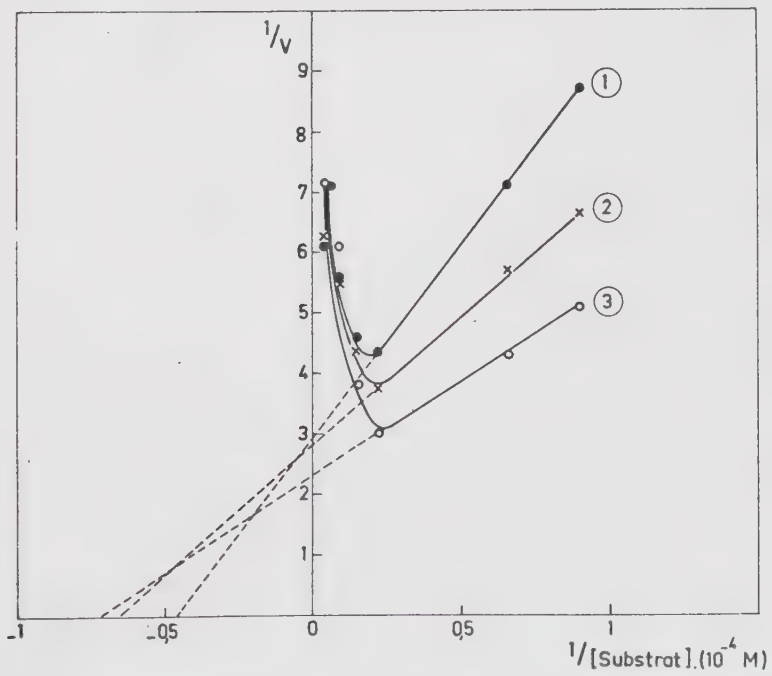


Figure 38 - Influence de la concentration du substrat sur la vitesse d'oxydation initiale de différents alcools avec des systèmes expérimentaux 7.10^{-3} M en NAD et contenant 0,2 mg de protéine, substrat : (1) 1-décanol ; (2) 1-dodécanol ; (3) 1-tétradécanol.

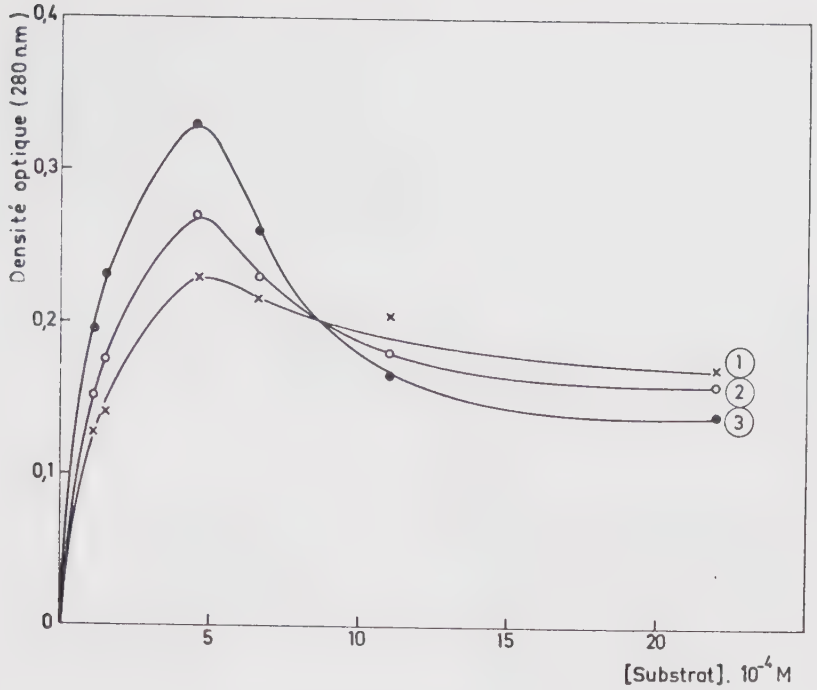


Figure 39 - Inhibition par excès de substrat de l'activité alcool-déshydrogénase soluble : représentation graphique suivant la méthode de LINEWEAVER-BURK. Systèmes expérimentaux identiques à ceux de la figure 1 : les activités alcool-déshydrogénases sont déterminées à l'égard du 1-décanol (1) du 1-dodécanol (2) et du 1-tétradécanol (3).

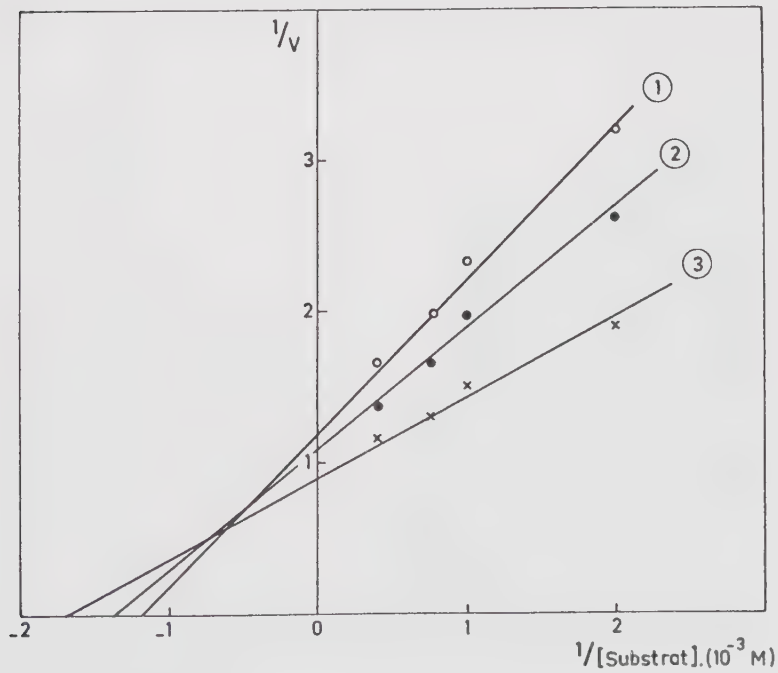


Figure 40 - Influence de la concentration en α-ω-diol sur la vitesse initiale d'oxydation de ce substrat : les activités sont déterminées à l'égard du 1.10-décanediol (1), du 1.11-undécanediol (2) et du 1.12-dodécanediol (3). Systèmes expérimentaux identiques à ceux de la figure 1.

La spécificité de substrat est résumée sur le Tableau XVI. On remarque que pour une même longueur de chaîne hydrocarbonée l'activité spécifique décroît lorsque la polarité de la molécule augmente et que, parmi les alcools secondaires, le 2-décanol est oxydé, mais le 5-décanol ne l'est pas.

TABLEAU XVI - Spécificité de substrat de l'alcool déshydrogénase soluble à l'égard de différents alcools

Substrat	Activité en %
1-décanol	100
2-décanol	80
5-décanol	0
9-décène-1-ol	42
1.10-décanediol	50

La figure 41 montre que les alcools primaires de C_2 à C_5 ne sont pas oxydés et qu'à partir de l'alcool en C_6 l'activité augmente progressivement et devient maximale pour le dodécanol.

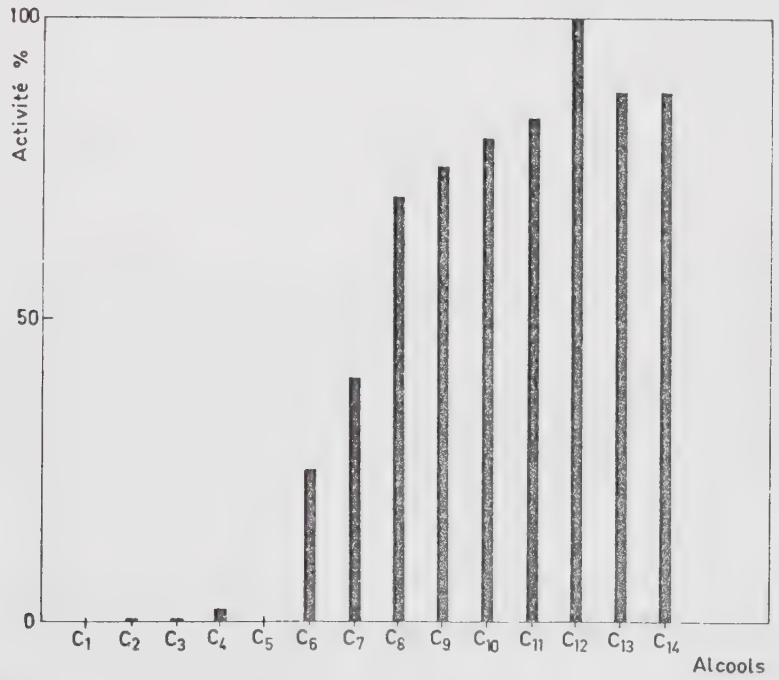


Figure 41 - Activité alcool-déshydrogénase soluble à l'égard des différents alcools primaires. L'activité est exprimée en % de l'activité mesurée avec le 1-dodécanol.

On peut se demander si le 1-décanol et le 1.10-décanediol sont métabolisés par la même enzyme ou par deux enzymes différentes. En faveur de la première hypothèse, il convient de souligner que le rapport des activités mesurées avec ces deux substrats demeure constant au cours de la purification. Un autre argument en faveur de la même conclusion est fourni par l'étude de l'inactivation thermique de la fraction purifiée. En effet, les cinétiques d'inactivation thermiques (figure 42 courbes 1 et 2) sont

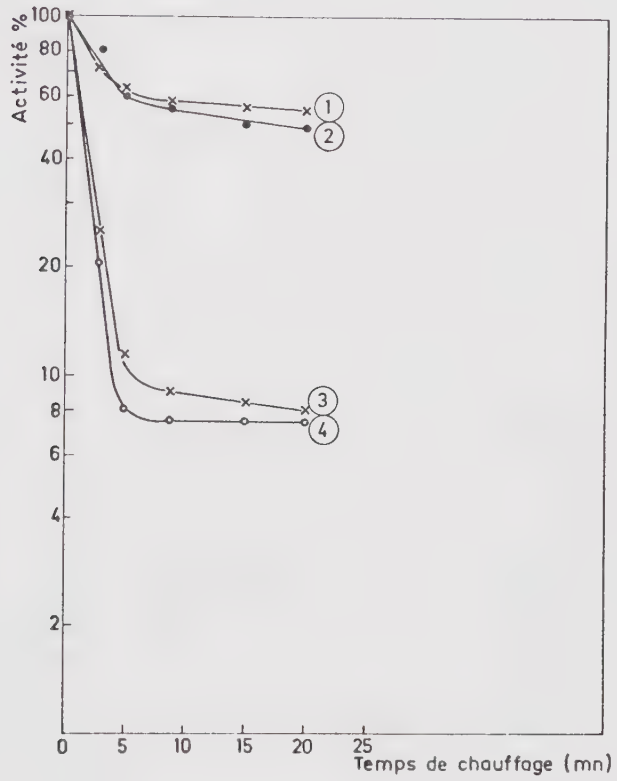


Figure 42 - Cinétique d'inactivation thermique des activités alcool-déshydrogénases soluble (1, 2) et particulaire (3, 4) de *C. tropicalis* cultivé sur n-tétradécane.
Les mélanges contenant les préparations enzymatiques (1 mg de protéines) sont incubés à 51°. Les activités alcool-déshydrogénases sont déterminées à l'égard du décanol (2, 4) et du décanediol (1, 3).

identiques pour les deux substrats considérés, c'est-à-dire pour le décanol et le 1.10-décanediol. Signalons d'autre part que l'enzyme soluble est moins thermosensible que l'alcool-déshydrogénase particulaire (figure 42).

L'action des inhibiteurs sur l'alcool-déshydrogénase est identique que l'activité soit mesurée en présence de 1-décanol ou de 1.10-décanediol (Tableau XVII). On remarque que l'activité enzymatique est insensible au

TABLEAU XVII - Influence de différents inhibiteurs sur l'activité alcool-déshydrogénase soluble, mesurée avec le 1-décanol et le 1.10-décanediol

Inhibiteur 10^{-3} M	Inhibition (%)	
	1-décanol	1.10-décanediol
Iodoacétate	21	20
Hydroxylamine	53	55
KCN	15	13
NaN_3	18	19
$HgCl_2$	100	100
PCMB	100	100
Fe^{++}	55	50
Cu^{++}	65	63
Inhibiteur 6.10^{-3} M		
n-décane	46	50
Phényl-décane	0	0
Fluorodécane	59	59
Chlorodécane	39	39
Bromodécane	31	31
Iododécane	23	23

KCN et au N_3Na. Cette observation rapproche cette enzyme de l'alcool-déshydrogénase de *S. cerevisiae* et la différencie de l'alcool-déshydrogénase particulaire de *C. tropicalis* déjà étudiée.

Le n-décane et ses dérivés halogénés ou sulfonés inhibent, à la concentration de 6.10^{-3} M, l'activité enzymatique à l'égard du 1-décanol. Ces observations rapportées sur le Tableau XVII montrent que l'inhibition

augmente avec l'électronégativité de l'halogène. Il est important de souligner que le phényl-décane contrairement au décane n'a aucune action inhibitrice.

°

° °

CONCLUSIONS

A - Les extraits bruts de *C. tropicalis* cultivé sur n-tétradécane catalysent la transformation en présence de NAD du 1-décanol et du décanal en acide décanoïque. Les activités alcool- et aldéhyde-déshydrogénases impliquées dans cette transformation sont localisées dans des fractions particulaires qui sédimentent à 220 000 x g. Ce résultat est en accord avec des observations déjà publiées qui nous avaient amenés à localiser ces deux activités dans les mitochondries et plus précisément dans les particules obtenues par traitement des mitochondries avec la digitonine.

On peut donc penser que les deux enzymes particulaires sont probablement localisées au niveau des membranes mitochondriales et qu'elles sont fortement associées l'une à l'autre. En effet, les essais de solubilisation et de séparation de l'alcool et de l'aldéhyde-déshydrogénases particulaires ont été négatifs. Par contre, plusieurs observations démontrent qu'il s'agit très probablement de deux enzymes distinctes, en particulier la différence de thermosensibilité des deux activités, l'alcool-déshydrogénase étant plus thermolabile et totalement inactivée après incubation de 5 mn à 45°, et le fait que l'alcool-déshydrogénase est seule à être inhibée par les acides gras.

La vitesse de réduction du NAD en présence d'extrait particulaire de *C. tropicalis* est maximale lorsque l'on utilise des solutions d'alcool ou d'aldéhyde dans la diméthylformamide, c'est-à-dire dans des conditions de dispersion maximum des substrats dans le système réactionnel. L'influence de la dispersion se manifeste, d'autre part, si l'on compare les K_m obtenus avec différentes émulsions.

L'utilisation de solutions dans la diméthylformamide permet de préciser la spécificité à l'égard du substrat. Plusieurs constatations s'imposent :

1) V_{max} augmente avec la longueur de la chaîne carbonée et donc avec l'insolubilité du substrat dans l'eau, ce qui est une indication en

faveur d'une action catalytique en milieu hétérogène. Cette observation concorde avec le comportement physiologique de *C. tropicalis* à l'égard des paraffines, c'est-à-dire avec le fait que cet organisme se développe plus rapidement à partir des alcanes à chaîne moyenne ou longue, allant de C_{10} à C_{16}.

2) Les extraits particulaires catalysent avec la même efficacité l'oxydation des alcools primaires et celle des α-ω-diols. La question que l'on peut se poser à ce propos est de savoir si ces deux types d'alcools sont substrats d'une même enzyme. De nombreuses observations vont dans ce sens, en particulier l'action des inhibiteurs et la thermolabilité. Il est important de souligner que l'oxydation des α-ω-diols supérieurs en présence de NAD n'est possible que pour des solutions de ces composés dans la diméthylformamide.

3) L'alcool-déshydrogénase particulaire de *C. tropicalis* diffère de l'alcool-déshydrogénase induite par les hydrocarbures de *P. aeruginosa* (VAN DER LINDEN et HUYBREGTSE,1969)en ce que contrairement à ce que nous avons constaté, l'affinité de cette dernière enzyme augmente avec la longueur de chaîne, et que par ailleurs elle est incapable de réduire le NAD et n'est active qu'avec le DCIP ou avec le cytochrome c de coeur de boeuf. Cependant, l'enzyme bactérienne comme celle de *C. tropicalis* est très active à l'égard des α-ω-diols et l'on peut se demander si ce fait à une signification physiologique, c'est-à-dire si l'oxydation des α-ω-diols participe au métabolisme des alcanes. Dans l'affirmative, ceci impliquerait un processus d'oxydation di-terminale, distinct des systèmes d'oxydation mono-terminale qui ont été décrits dans les chapitres précédents.

B - En dehors des alcool- et aldéhyde-déshydrogénases particulaires, mitochondriales, *C. tropicalis* possède également une ou plusieurs alcool- et aldéhyde-déshydrogénases solubles, probablement cytoplasmiques.

1) Plusieurs de nos observations tendent à indiquer que ces déshydrogénases solubles ne résultent pas d'une solubilisation partielle des déshydrogénases particulaires et sont des enzymes distinctes. On verra dans le chapitre suivant, que les déshydrogénases solubles sont totalement absentes dans les cellules cultivées sur glucose, et sont donc spécifiquement induites par les alcanes, alors que les enzymes particulaires sont toujours présentes, mais à des niveaux différents suivant les conditions de culture.

De plus, les activités des alcool-déshydrogénases soluble et particulaire présentent des différences significatives portant sur la thermosensibilité et sur la variation des paramètres cinétiques en fonction de la nature du substrat et de la longueur de sa chaîne carbonée.

2) Les alcool-déshydrogénases soluble et particulaire de *C. tropicalis* sont toutes deux inactives à l'égard de l'éthanol. Cette observation présente un certain intérêt. En effet au cours d'une étude antérieure sur l'alcool-déshydrogénase soluble qui est induite par les alcanes chez *Saccharomyces cerevisiae*, ROCHE et AZOULAY (1969) avaient constaté que les extraits actifs à l'égard des alcools supérieurs présentent également une faible activité éthanol-déshydrogénase. Il est vraisemblable que cette dernière activité correspondait en fait à une contamination des préparations par l'éthanol-déshydrogénase classique de *S. cerevisiae*.

3) Au cours de la purification de l'alcool-déshydrogénase soluble, le rapport des activités à l'égard des mono-alcools et des α-ω-diols demeure inchangé. D'autre part les courbes d'inactivation thermique sont identiques pour ces deux types de substrats. Ces faits permettent de penser que les mono-alcools et les α-ω-diols sont déshydrogénés par la même enzyme. Toutefois, il convient de souligner que l'activité à l'égard des alcools primaires est inhibée par un excès de substrat, ce qui ne s'observe pas dans le cas des diols. Cette différence de comportement reste à expliquer.

4) L'alcool-déshydrogénase soluble présente d'intéressantes particularités cinétiques. Pour une longueur de chaîne carbonée identique, l'enzyme est plus active à l'égard du mono-alcool primaire qu'à l'égard de l'α-ω-diol, ou de l'alcool ω-éthylénique. D'autre part l'enzyme est totalement inactive à l'égard des mono-alcools primaires inférieurs à C_6, des mono-alcools secondaires, des ω-hydroxyacides et des diols chez qui une fonction alcool secondaire est située à proximité de la fonction primaire.

En d'autres termes, l'introduction d'un second groupement polaire dans la molécule de substrat entraîne une diminution de l'activité (alcools ω-éthyléniques et α-ω-diols) ou même sa perte totale (ω-hydroxyacides et 1.2-diol).

VAN DER LINDEN et HUYBREGTSE (1969) ont fait les mêmes constatations dans le cas de l'alcool-déshydrogénase de *P. aeruginosa* et ces

auteurs ont d'autre part démontré que cette enzyme est active sur les esters méthyliques des ω-hydroxyacides, et donc lorsque la polarité de la fonction acide est supprimée.

Ce comportement des alcool-déshydrogénases solubles pourrait s'expliquer en considérant que ces enzymes comportent deux sites distincts d'attachement du substrat, l'un hydrophile, fixant le groupement hydroxyle dans les conditions étudiées par SUND et THEORELL (13) pour l'éthanol déshydrogénase classique, l'autre hydrophobe, contractant des liaisons avec les groupements méthyle ou méthylène. Dans ces conditions, on comprendrait que l'enzyme ne soit active qu'à l'égard des substrats comportant un groupement hydroxyle et une région non-polaire séparés l'un de l'autre à distance appropriée. On comprendrait aussi que les substrats possédant en fin de chaîne un groupement très polaire (ω-hydroxyacides) ne soient pas oxydés et que, chez *C. tropicalis*, le produit final d'oxydation des α ω-diols soit l'ω-hydroxyacide correspondant et non pas le diacide. Enfin, on comprendrait que dans le cas des molécules contenant en dehors de la fonction hydroxyle un autre groupement polaire à l'extrémité de la chaîne, l'enzyme soit active à condition que le second groupement soit relativement peu polaire (diols, alcools ω-éthyléniques, methyl esters des ω-hydroxy-acides) et situé à distance suffisante du site d'attachement hydrophobes. Cette interprétation concorde avec le fait que l'affinité de l'alcool-déshydrogénase soluble augmente avec la longueur de chaîne des mono-alcools et des α-ω-diols. Elle concorde également avec le fait que les molécules totalement hydrophobes, telles que les alcanes (n-décane), inhibent l'alcool-déshydrogénase soluble, et que leurs dérivés halogénés, moins hydrophobes, sont également inhibiteurs mais à un degré moindre (Tableau XVI).

Un modèle similaire, comportant deux sites d'attachement, l'un hydrophile et l'autre hydrophobe, a déjà été proposé par BARDLEY et coll. (14) pour expliquer le comportement de la diamine-oxydase à l'égard de ses différents substrats.

CHAPITRE VII

REGULATION DES ENZYMES IMPLIQUEES DANS L'OXYDATION DES ALCANES

Introduction

On a vu dans les Chapitres précédents que *Candida tropicalis*, ainsi que d'autres organismes capables de se développer à partir des hydrocarbures, possèdent une grande variété d'enzymes susceptibles d'intervenir dans l'oxydation des alcanes en acides gras. Chez le même organisme coexistent deux systèmes enzymatiques capables de convertir les alcanes en alcools, l'un par hydroxylation, l'autre par déshydrogénation. D'autre part, l'oxydation des alcools en acides peut être réalisée par deux séries de déshydrogénases, les unes mitochondriales et particulaires, les autres solubles et probablement cytoplasmiques.

On doit se poser la question du rôle physiologique de ces diverses enzymes. Dans ce but, nous avons étudié leur régulation chez *C. tropicalis* souche 101 et, comparativement, chez une autre levure (*Saccharomyces cerevisiae*) et chez une bactérie (*Pseudomonas oleovorans*).

1.- Activité alcane-déshydrogénase

Les cellules de *C. tropicalis* (souche 101) cultivées sur glucose possèdent une activité alcane-déshydrogénase, mais le niveau cellulaire de cette activité de base ne représente que le dixième de celui qui est relevé lorsque cette levure est cultivée sur n-tétradécane (Tableau XVIII). La culture sur oléfine a également un effet inducteur, mais moins marqué, l'accroissement par rapport au niveau de base n'étant en ce cas que d'environ deux fois.

L'induction de l'alcane-déshydrogénase par l'alcane est encore plus nette dans le cas de *S. cerevisiae* dont les cellules cultivées sur glucose sont totalement dépourvues de cette activité. D'autre part, chez

TABLEAU XVIII - Activités enzymatiques des extraits acellulaires de *C. tropicalis* cultivé sur différents substrats

Substrat de croissance	Enzymes						
	Alcane déshydrogénase*		Alcool déshydrogénase*		Aldéhyde déshydrogénase*		Palmityl-CoA synthétase**
	SAT	101	SAT	101	SAT	101	101
Glucose	0	50	142	38	80	61	40
n-tétradécane	664	485	925	600	925	647	57
1-tétradécène	6	113	48	132	64	227	35
1-tétradécanol	240	206	275	249	333	275	53
Tetradécanal	136	95	186	130	219	173	52
Acide tétradécanoïque	180	57	271	55	287	110	28
Acide 1.10-décane dicarboxylique	279	92	279	87	390	173	48

*Les activités sont exprimées en nanomoles de NAD réduit par minute et par mg de protéines.

**L'activité est exprimée en nanomoles d'hydroxamate formée par minute et par mg de protéines.

S. cerevisiae, l'oléfine n'a pas d'effet inducteur.

Il est intéressant de noter que chez *S. cerevisiae* l'alcane déshydrogénase est induite non seulement par son substrat, mais encore de façon récurrente par les produits immédiats et secondaires de son activité, c'est-à-dire par les alcools primaires, les aldéhydes et les acides gras, et même par les acides dicarboxyliques, bien que ces derniers ne figurent pas parmi les intermédiaires directs du métabolisme considéré (Tableau XVIII). Certaines de ces inductions récurrentes paraissent s'exercer également chez *C. tropicalis*, mais pour cet organisme, les données expérimentales sont moins probantes du fait que les organismes témoins, c'est-à-dire les cellules cultivées sur glucose, ont une activité de base non négligeable.

Il convient de rappeler ici que *Pseudomonas oleovorans* est toujours dépourvu d'activité alcane-déshydrogénase, même lorsque cet organisme est cultivé sur hydrocarbures.

2.- Système hydroxylase

Les extraits particulaires de *C. tropicalis* cultivé sur n-tétradécane, possèdent une activité hydroxylase à l'égard de l'acide laurique, environ quarante fois plus élevée que celle déterminée dans les mêmes conditions avec des extraits provenant de cellules cultivées sur glucose (Tableau XIX).

Le 1-tétradécène induit également l'activité hydroxylase ; par contre le 1-tétradécanol et l'acide tétradécanoïque n'ont aucun effet.

Le cytochrome P_{450} est spécifiquement induit par le n-tétradécane et le 1-tétradécène (Tableau XIX). La figure 42 montre les spectres obtenus lors de la recherche du cytochrome P_{450} avec des extraits provenant de cellules cultivées sur n-tétradécane ou sur glucose. Il convient de souligner que contrairement au cytochrome P_{450}, la NADPH cytochrome c-réductase est toujours présente, quelles que soient les conditions de culture de cette levure, mais que son niveau est environ 5 fois plus élevé pour des cellules cultivées sur alcane ou alcène.

Il ressort de ces observations que le système hydroxylase est fonctionnellement lié au métabolisme des alcanes, mais on peut néanmoins se demander à quel niveau se situe son intervention dans ce métabolisme. Il est possible en effet que l'hydroxylase intervienne dans l'étape primaire, c'est-à-dire dans la conversion de l'alcane en alcool. Mais il est également possible que sa fonction réelle soit l'hydroxylation des acides gras en ω-hydroxy acides.

TABLEAU XIX - Induction du système hydroxylase chez *C. tropicalis* : influence du substrat de croissance

Substrat de croissance	Cytochrome P_{450} (1)	NADPH-cytochrome c-réductase (2)	Activité hydroxylase (3)
Glucose	0,00	32	0,1
Tétradécane	0,05	175	3,9
1-tétradécène	0,05	180	3,3
1-tétradécanol	0,00	27	0,1
Acide tétradécanoïque	0,00	28	0,05

(1) nanomoles par mg de protéines ; (2) nanomoles de cytochrome c réduit par minute et par mg de protéines ; (3) nanomoles d'acide laurique hydroxylé par minute et par mg de protéines.

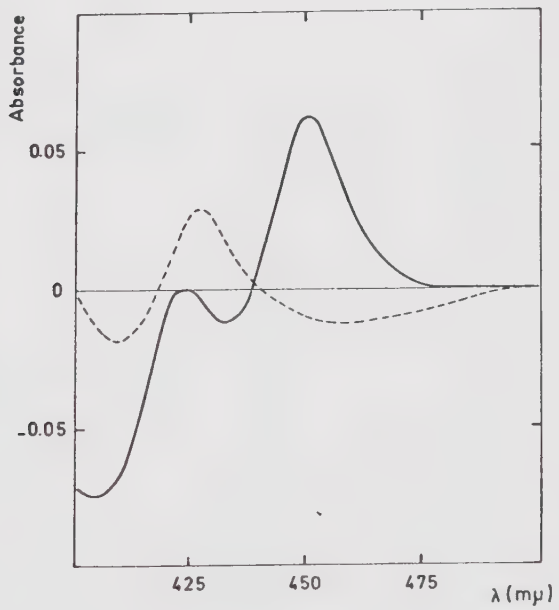


Figure 43 - Spectre différentiel d'un extrait acellulaire de *C. tropicalis* cultivé sur n-tétradécane (——) ou sur glucose (---).

En effet, la souche 101 de *C. tropicalis*, sélectionnée par DUVNJAK et coll. (1969) pour les bons rendements de son développement sur alcanes, a la propriété de produire dans ses cultures des diacides, et de ne pas accumuler de mono-acides. D'autre part, les mêmes auteurs ont montré que la souche considérée possède une activité diacide-CoA-synthétase très élevée. En conséquence, il se peut que le système hydroxylase induit par les hydrocarbures ait pour rôle de convertir en diacides les mono-acides toxiques provenant des alcanes.

Chez *Pseudomonas oleovorans*, l'oxydation de l'octane est un processus adaptatif (VAN ECK et coll., 1970). Nos propres expériences ont été réalisées avec des cellules cultivées sur octane ou sur octène et avec des suspensions non proliférantes de cellules cultivées sur malonate et incubées pendant 3 heures en présence de ces substrats. Les résultats obtenus (Tableau XX) confirment que les bactéries adaptées à l'octane sont simultanément adaptées à la mono- et à la di-oléfine, à l'alcool primaire et à

TABLEAU XX - Consommation d'oxygène en présence de différents substrats par des cellules de *P. oleovorans* cultivées sur octane ou 1-octène ou induites par ces mêmes composés

$-Q_{O_2}$	Cellules cultivées sur octane ou 1-octène	Cellules induites par l'octane ou le 1-octène
Octane	135	110
1-octène	126	108
1.7-octadiène	90	92
2.5-dimethylhexane	40	40
1.2-epoxyoctane	30	30
1-octanol	130	110
Octanal	115	110
Acide octanoïque	110	90
Cyclohexane	80	75
Methylcyclohexane	90	85
Phenyloctane	80	72

Activité métabolique $-Q_{O_2}$ exprimée en µl O_2 consommés par heure et par mg de cellules (poids sec).

l'aldéhyde correspondants, ainsi qu'à divers autres substrats. Par contre, le Tableau XXI montre que seules les cellules induites par l'octane ou par l'octène sont capables d'oxyder ces composés. On voit, en effet, que les cellules induites par l'octanol, l'octanal ou l'acide octanoïque sont évidemment capables respectivement d'oxyder ces substrats, mais pas l'octane.

TABLEAU XXI - Consommation d'oxygène en présence de différents composés par des cellules de *P. oleovorans* sur malonate et induites par ces mêmes composés

Inducteur	$-Q_{O_2}$ avec octane*	$-Q_{O_2}$ avec l'inducteur
Octane	135	135
1-octène	126	120
1.7-octadiene	0	0
2.5-dimethylhexane	0	0
1.2-epoxyoctane	0	0
1-octanol	0	120
Octanal	0	130
Acide octanoïque	0	145
Cyclohexane	0	0
Methylcyclohexane	0	0
Phenyloctane	0	0

*Activité métabolique - Q_{O_2} exprimée en µl O_2 consommés par heure et par mg de cellules (poids sec).

Comme *P. oleovorans* ne possède pas de système alcane-déshydrogénase, mais seulement le système hydroxylase, il est clair que c'est ce dernier qui est spécifiquement induit par l'alcane et par la 1-oléfine correspondante. Ceci est d'ailleurs démontré plus directement par le fait que seuls les extraits obtenus à partir de cellules cultivées sur n-octane ou 1-octène sont douées d'activité hydroxylase. Les autres substrats du système hydroxylase, y compris les acides gras, ne sont pas inducteurs, bien que certains

d'entre eux, comme l'octadiène soit hydroxylés plus rapidement que l'alcane ou la mono-oléfine (Tableau XXII).

TABLEAU XXII - Spécificité de substrat du système hydroxylase chez *P. oleovorans* cultivé sur n-heptane

Substrat	Concentration		Activité
	M		
*(Octane	5	10^{-4}	100
(Octanoate	2.5	10^{-3}	23
(Cyclohexane	2.5	10^{-3}	19
(Methylcyclohexane	5	10^{-4}	43
(2.5-dimethylhexane	2.5	10^{-4}	13
**(1-Octène	5	10^{-4}	100
(1.7-octadiène	5	10^{-4}	110
(1.2-epoxyde	5	10^{-4}	20
(Phenyloctane	5	10^{-4}	30

*D'après E.J. Mc KENNA et M.J. COON, J. Biol. Chem., *245*, 3882, 1970.

**Communication personnelle : Dr. BOYER, Department of Biochemistry, Medical School, University of Michigan, Ann Arbor 48104, U.S.A.

3.- Alcool- et aldéhyde-déshydrogénases particulaires

Lorsque les cellules de *C. tropicalis* sont cultivées en aérobiose sur n-tétradécane, leurs extraits particulaires catalysent l'oxydation des alcools et aldéhydes supérieurs en présence de NAD avec des niveaux enzymatiques moyens de l'ordre de 600 unités (Tableau XXIII), c'est-à-dire environ 15 fois supérieurs à ceux des cellules sur glucose. La croissance à partir de l'oléfine, de l'alcool et de l'aldéhyde correspondant au n-tétradécane permet d'obtenir des extraits ayant des activités enzymatiques nettement plus fortes que le niveau de base obtenu avec des cultures sur glucose. Ces observations montrent que ces enzymes sont inductibles et que les inducteurs

TABLEAU XXIII - Activité spécifique des extraits particulaires de *C. tropicalis* cultivé sur différents substrats

Substrat de croissance	Activité*	
	Alcool déshydrogénase	Aldéhyde déshydrogénase
Glucose	39	61
n-tétradécane	600	647
1-tétradécène	132	227
1-tétradécanol	249	275
Tétradécanal	130	173
Acide tétradécanoïque	55	110

*exprimée en nanomoles de NAD réduit par minute et par mg de protéines.

semblent être successivement le n-tétradécane, l'alcool et l'aldéhyde correspondants. Comme on pouvait le prévoir, les acides gras n'ont aucun effet sur la synthèse de ces différentes enzymes.

4.- Alccol- et aldéhyde-déshydrogénases solubles

Les activités alcool et aldéhyde déshydrogénases solubles sont présentes dans les extraits surnageants de *C. tropicalis* cultivé sur n-tétradécane, sur alcool ou sur aldéhyde avec des niveaux de l'ordre de 350 à 500 unités par mg de protéines. Enfin, il convient de souligner que les extraits des cellules cultivées sur glucose ou sur acide gras n'ont aucune activité enzymatique.

Ce dernier résultat différencie ces enzymes de celles de nature particulaire qui présentent toujours un niveau de base non négligeable.

5.- Acyl-CoA-synthétases

Le Tableau XXIII montre que les acyl-CoA synthétases étudiées par

DUVNJAK (1970) sont constitutives et que leur niveau cellulaire est identique que les levures soient cultivées sur glucose, sur n-tétradécane, ou sur les divers intermédiaires de l'oxydation de cet alcane.

Ces résultats concordent avec ceux de DUVNJAK qui a constaté que les enzymes impliquées dans la β-oxydation des acides gras à chaîne moyenne et des diacides sont également de nature constitutive.

°

° °

Discussion et conclusions

Il ressort de nos observations que les enzymes participant à l'oxydation des alcanes sont soumises à une régulation complexe et dont les modalités diffèrent suivant l'organisme considéré.

Chez *Pseudomonas oleovorans*, bactérie qui ne possède pas d'activité alcane déshydrogénase, mais seulement le système hydroxylase, il est évident que c'est ce dernier qui assure l'oxydation des alcanes. D'autre part, ce système hydroxylase est de nature inductible, et n'est présent dans les cellules que lorsque celles-ci ont été cultivées en présence soit d'alcane (n-octane) soit d'alcène (1-octène). Il est remarquable que les dérivés oxygénés des alcanes (alcool, aldéhyde et acide gras) ne sont pas inducteurs, bien que l'acide gras soit un bon substrat de l'hydroxylase.

Chez *Candida tropicalis* souche 101, la situation est plus complexe. En effet, les cellules cultivées sur glucose seul ont à l'égard des alcanes une activité respiratoire non négligeable et voisine de celle relevée avec les cellules cultivées sur les alcanes. Cependant, la culture sur alcane entraîne une élévation très marquée du niveau des enzymes impliquées dans l'oxydation des paraffines et a donc un effet inducteur. Celui-ci diffère sensiblement suivant l'enzyme considérée.

Le niveau de l'activité alcane-déshydrogénase est accrue de dix fois environ dans les cellules cultivées sur n-tétradécane. Le produit direct de cette activité, c'est-à-dire l'oléfine (1-tétradécène) et, parmi les intermédiaires ultérieurs du métabolisme, l'alcool primaire et l'aldéhyde induisent eux aussi, mais moins efficacement, le système alcane-déshydrogénase. Par contre, l'acide gras correspondant n'est pas inducteur.

L'activité hydroxylase des cellules cultivées sur glucose est très faible sinon nulle. D'autre part, ces cellules ne contiennent pas de quantité décelable de cytochrome P_{450}, qui est un des constituants essen-

tiels du système hydroxylase chez les Eucaryotes. L'alcane ou l'alcène, mais aucun autre produit d'oxydation des paraffines, induisent simultanément l'activité hydroxylase, le cytochrome P_{450} et l'activité NADPH-cytochrome c réductase. Les acides gras, qui sont les meilleurs substrats de l'hydroxylase, n'ont aucun effet inducteur à son égard ni à l'égard de ses constituants (cytochrome P_{450} et NADPH-cytochrome c réductase).

Ces observations présentent un grand intérêt. En effet, le fait que l'activité hydroxylase est absente dans les cellules cultivées sur glucose implique que la forte activité respiratoire de ces cellules à l'égard des alcanes n'est pas due à l'hydroxylase, mais au système alcane-déshydrogénase, lequel est présent dans les cellules considérées. En d'autres termes, ces faits constituent un important argument en faveur du rôle fonctionnel du système alcane-déshydrogénase.

Un autre fait remarquable est que les deux systèmes susceptibles de réaliser la première étape de l'oxydation des alcanes, c'est-à-dire le système alcane déshydrogénase et le système hydroxylase sont l'un et l'autre de nature particulaire. Toutefois, nos résultats ne permettent pas de préciser si ces particules sont d'origine microsomale ou mitochondriale.

En ce qui concerne les autres enzymes de *C. tropicalis* participant au métabolisme des alcanes, les alcool- et aldéhyde-déshydrogénases particulaires, localisées dans les membranes mitochondriales, sont de nature constitutive. Par contre les alcool- et aldéhyde-déshydrogénases solubles sont spécifiquement induites par leurs substrats respectifs et par les alcanes.

Enfin les acyl-CoA synthétases sont de nature constitutive, ce qui concorde avec le fait que ces enzymes ne sont pas spécifiques du métabolisme des paraffines.

CONCLUSIONS ET DISCUSSION GENERALES

Dans ce travail, nous nous sommes efforcés d'isoler et de caractériser les enzymes directement impliquées dans l'oxydation des alcanes chez *Candida tropicalis*. Les principaux résultats expérimentaux que nous avons obtenus peuvent être résumés comme suit :

1°) Les extraits acellulaires de *C. tropicalis* cultivé sur n-tétradécane catalysent la réduction de NAD^+ en présence de n-décane. Cette activité enzymatique est ATP-dépendante. Elle est localisée dans des fractions particulaires d'origine mitochondriale et s'y trouve toujours associée à l'activité cytochrome oxydase et à des activités alcool- et aldéhyde-déshydrogénases NAD-dépendantes.

2°) La réduction du NAD en présence d'alcane s'effectue aussi bien en anaérobiose qu'en aérobiose et conduit dans les deux cas à la formation de l'alcool primaire et de l'acide gras correspondants. En présence d'oxygène, l'addition d'ATP est nécessaire. Par contre, en anaérobiose, l'ATP n'est pas indispensable, mais ajouté au système à concentration millimolaire double néanmoins la vitesse de réduction du NAD^+.

3°) Ces faits expérimentaux suggèrent l'existence chez *C. tropicalis* d'une alcane-déshydrogénase similaire à celle qui a d'abord été mise en évidence chez la bactérie *Pseudomonas aeruginosa* (SENEZ et AZOULAY, 1961) puis chez la levure *Candida rugosa* (IIZUKA et coll., 1969). Chez ces deux organismes, l'hypothèse d'une déshydrogénation initiale de l'alcane a pu être confirmée par la mise en évidence de la 1-oléfine correspondante. Chez *C. tropicalis*, la formation intermédiaire de l'alcène n'a pu être démontrée analytiquement. Aussi bien en anaérobiose qu'en aérobiose, les seuls produits décelables de la réaction sont l'alcool primaire et l'acide gras. Toutefois, ces résultats négatifs n'excluent pas une déshydrogénation initiale de l'alcane. Il est possible, en effet, que dans les particules actives l'alcane-déshydrogénase forme avec l'alcool et l'aldéhyde déshydro-

génase un complexe multi-enzymatique dont l'activité serait limitée par la première étape, de telle sorte que l'oléfine formée ne puisse pas s'accumuler en quantités détectables.

4°) Nous avons d'autre part constaté l'existence chez *C. tropicalis* d'un système hydroxylase NADPH-dépendant, similaire à celui qui a été mis en évidence par le groupe de COON chez les bactéries et chez les mammifères.

Comme dans le cas des mammifères (hepatocytes du rat), le système hydroxylase de *C. tropicalis* fait intervenir le cytochrome P_{450}. Il hydroxyle les alcanes en alcools primaires, mais son activité est environ trois fois plus élevée à l'égard des acides gras, lesquels sont convertis en ω-hydroxyacides.

Ce système hydroxylase ne fonctionne qu'en présence d'oxygène. Il est lui aussi de nature particulaire, mais, n'étant pas localisé dans les mitochondries, il est probablement attaché aux membranes microsomales (GALLO et coll., 1971). Les particules douées de l'activité hydroxylase ont également des activités alcool et aldéhyde-déshydrogénases NAD-dépendantes. Il aurait été intéressant de pouvoir déterminer si ces particules sont identiques à celles qui réduisent le NAD en présence d'alcane. Mais, la préparation de ces particules nécessite, pour préserver le cytochrome P_{450}, d'opérer en présence de concentrations élevées en glycérol, conditions dans lesquelles l'activité alcane-NAD réductase est complètement inhibée.

5°) En dehors des activités alcool- et aldéhyde-déshydrogénases qui sont particulaires, localisées dans les mitochondries et étroitement liées aux activités alcane-NAD réductase et hydroxylase, *C. tropicalis* possède des alcool et aldéhyde déshydrogénases solubles, elles aussi spécifiques pour le NAD.

L'hypothèse que ces déshydrogénases cytoplasmiques correspondent à la solubilisation partielle des enzymes particulaires semble pouvoir être écartée. En effet les propriétés des enzymes solubles présentent d'importantes différences par rapport aux enzymes particulaires. En particulier, dans le cas de l'alcool déshydrogénase soluble, l'affinité pour le substrat et la vitesse maximum croissent avec la longueur de la chaîne carbonée. Ce comportement, qui est inverse de celui de l'enzyme particulaire, nous a conduit à considérer que l'enzyme soluble possède vraisemblablement,comme SUND et THEORELL (1963) l'ont établi pour l'éthanol

déshydrogénase de levure, deux sites distincts de fixation du substrat, l'un hydrophile et l'autre hydrophobe.

6°) Une autre différence significative entre les alcool- et aldéhyde-déshydrogénases solubles et particulaires est que les enzymes solubles sont spécifiquement induites par les alcanes et les alcènes, tandis que les enzymes particulaires sont constitutives.

En ce qui concerne leur régulation, le système hydroxylase et le système alcane-NAD réductase sont tous deux de nature inductible. Cependant, si les cellules cultivées sur glucose, en l'absence d'inducteur, sont totalement dépourvues d'activité hydroxylase, elles sont capables d'oxyder rapidement les alcanes et leurs extraits possèdent une activité alcane-NAD réductase non négligeable, correspondant à 10 pour cent environ de celle des cellules cultivées sur hydrocarbure.

°
° °

De l'ensemble de ces données expérimentales, il résulte qu'il existe chez *C. tropicalis* une grande variété d'enzymes susceptibles d'assurer l'oxydation des hydrocarbures paraffiniques. Cette multiplicité enzymatique se manifeste aussi bien au niveau de l'attaque primaire du substrat, c'est-à-dire de la conversion de l'alcane en alcool primaire, que dans les stades ultérieurs conduisant de l'alcool à l'acide gras, en passant par l'aldéhyde.

En ce qui concerne l'oxydation de l'alcane en alcool, celle-ci peut a priori être réalisée par l'un ou l'autre des deux systèmes enzymatiques que nous avons mis en évidence, c'est-à-dire par le système alcane-NAD réductase et par le système hydroxylase.

La première de ces deux voies est similaire et celle qui a été démontrée chez les bactéries et chez *C. rugosa*. Cependant, chez *C. tropicalis*, le fait qu'en anaérobiose la réduction du NAD en présence d'alcane conduit à la formation d'alcool et d'acide, sans accumulation de l'oléfine, implique que chez cet organisme, à la différence de ce qui a été établi chez les bactéries, l'oléfine provenant d'une déshydrogénation initiale serait hydratée en alcool, sans intervention de l'oxygène libre.

En fait, l'hypothèse d'une déshydrogénation initiale de l'alcane se heurte à plusieurs arguments. En dehors du fait qu'il n'a pas été possible de mettre en évidence la formation d'oléfine, les quantités de

1-décanol et d'acide décanoïque produites à partir du n-décane ne représentent, en effet, qu'un pour cent environ de celles qui correspondraient stoechiométriquement au NAD réduit (LEBEAULT et AZOULAY, 1970c). Il est donc possible que la réduction du NAD dans ces systèmes expérimentaux corresponde à un processus autre que la déshydrogénation de l'alcane, ou encore qu'à cette déshydrogénation se superpose un autre phénomène.

Dans une série d'expériences préliminaires, nous avons pu mettre en évidence, par chromatographie en phase gazeuse, l'adsorption, sur les particules douées d'activité alcane-NAD réductase, d'un mélange d'alcools aliphatiques à longue chaîne. Ces composés toutefois ne sont présents qu'en quantités trop faibles pour pouvoir être identifiés et dosés. D'autre part, on sait que les alcools aliphatiques à longue chaîne tendent à se fixer par des liaisons hydrogène sur les régions hydrophobes de certaines protéines et peuvent être déplacés de ces sites d'attachement par d'autres composés hydrophobes, notamment par les hydrocarbures paraffiniques (MOHAMMADZADEH et coll., 1967, 1969 ; REYNOLDS et coll., 1968 ; CECIL et LOUIS, 1970).

En conséquence, il est possible que dans les conditions de nos expériences, la réduction du NAD corresponde au moins en partie au déplacement par l'alcane d'alcools adsorbés sur les protéines particulaires et à leur oxydation consécutive par l'alcool-déshydrogénase particulaire.

Une autre objection importante à l'encontre d'une déshydrogénation de l'alcane est le fait que *C. tropicalis* est incapable de se développer en anaérobiose à partir des hydrocarbures paraffiniques. En effet, si cet organisme peut en l'absence d'oxygène convertir l'alcane en oléfine puis en alcool et finalement en acide, on devrait s'attendre à ce qu'il puisse faire fermenter les paraffines. Cependant, le fait qu'il n'en soit rien peut s'expliquer simplement par l'exigence de l'oxygène et de la chaîne respiratoire pour la réoxydation des pyridine-nucléotides réduits au cours des diverses déshydrogénations que comporte ce métabolisme.

Les arguments en faveur d'une activité alcane-déshydrogénase sont eux aussi de nature indirecte. Ils consistent essentiellement dans le fait que l'autre voie par laquelle l'alcane peut être oxydé en alcool, c'est-à-dire celle du système hydroxylase, ne peut manifestement pas intervenir dans certaines conditions expérimentales où les paraffines sont néanmoins oxydées par les cellules entières ou par les extraits enzymatiques. C'est ainsi que les cellules de *C. tropicalis* cultivées sur glucose sont, comme nous l'avons établi, totalement dépourvues de cytochrome P_{450}, mais qu'elles oxydent cependant très activement les paraffines. Ces mêmes cellules ont une activité alcane-NAD réductase relativement élevée et il est

donc très vraisemblable que, dans ce cas particulier au moins, l'attaque initiale de l'alcane consiste dans une déshydrogénation.

De même, nous avons établi qu'en anaérobiose et en présence de NAD, les extraits particulaires des cellules induites produisent à partir du n-décane des quantités de 1-décanol et d'acide décanoïque qui sont inférieures à celles correspondant au NAD réduit mais qui n'en sont pas moins significatives. Comme le système hydroxylase est totalement inactif en l'absence d'oxygène libre, la seule explication possible de la formation d'alcool et d'acide dans ces systèmes est une déshydrogénation de l'alcane suivie d'une hydratation de l'oléfine ainsi produite.

Un dernier argument indirect en faveur d'une déshydrogénation de l'alcane par *C. tropicalis* est sa démonstration expérimentale chez certaines bactéries et chez une autre espèce de *Candida*.

Il ressort de ces considérations que chez *C. tropicalis* coexistent vraisemblablement deux voies métaboliques capables de convertir les paraffines en alcool primaire. L'une de ces voies, qui a pu être mise en évidence sans ambiguité, consiste dans une hydroxylation strictement aérobie de l'alcane. L'autre voie, suggérée par la mise en évidence d'une activité alcane-NAD réductase, est celle d'une déshydrogénation de l'hydrocarbure en oléfine. Bien que la formation de cet intermédiaire n'ait pu être démontrée, et malgré les réserves qu'impose la non stoechiométrie de la réaction, il semble bien que seule la déshydrogénation de l'alcane puisse expliquer la formation d'alcool et d'acide en anaérobiose. En admettant que ces deux modes d'attaque primaire des alcanes coexistent, il resterait à préciser quelles sont leurs importances respectives du point de vue physiologique.

Qu'elle résulte d'une hydroxylation ou d'une déshydrogénation, l'oxydation de l'alcane conduit dans l'un ou l'autre cas à la formation de l'alcool primaire correspondant. L'oxydation ultérieure de celui-ci en aldéhyde puis en acide gras peut être effectuée par deux séries de déshydrogénases les unes mitochondriales, les autres solubles. Ici encore, on peut se demander quelles sont physiologiquement les importances respectives de ces enzymes. Nos études ne permettent pas de répondre de façon concluante à cette question. Cependant le fait que l'alcool et l'aldéhyde-déshydrogénases solubles sont induites par les alcanes suggère fortement qu'elles interviennent dans le métabolisme considéré. D'autre part, le fait que les cellules non-induites sont néanmoins capables d'oxyder les alcanes suggère que les déshydrogénases particulaires, lesquelles sont

constitutives, ont elles-mêmes un rôle physiologique dans le métabolisme des paraffines. En d'autres termes, il semble donc que les deux types d'alcool et d'aldéhyde-déshydrogénases participent à l'oxydation des paraffines.

Du fait de leur localisation dans la cellule, et de leur régulation, on est tenté de rapprocher l'alcool et l'aldéhyde-déshydrogénases solubles du système hydroxylase, lequel est lui aussi inductible et de siège non mitochondrial. Par contre, l'alcool- et l'aldéhyde-déshydrogénases particulaires étant mitochondriales et constitutives sont à rapprocher du système alcane-NAD réductase qui est lui aussi localisé dans les mitochondries et présent même dans les cellules non induites. Ces faits conduisent à envisager deux grandes voies métaboliques entre les alcanes et les acides gras, l'une mitochondriale et constitutive, l'autre cytoplasmique ou microsomale et inductible.

BIBLIOGRAPHIE

AGUIRRE, M.J.R. et VILLANUEVA, J.R. (1962) Nature, *196*, 693.

ALI KHAN, M.Y., HALL, A.N. et ROBINSON, D.S. (1963) Nature, *198*, 289.

ALI KHAN, M.Y., HALL, A.N. et ROBINSON, D.S. (1964) Antonie Van Leeuwenhoek, *30*, 417.

ANDERSON, F.B. et MILLBANK, J.W. (1966) Biochem. J., *99*, 682.

APPERT, J. (1952) Rev. Inst. Fr. Pétrole, *7*, 170.

AZOULAY, E. (1966) Thèse, Faculté des Sciences de Marseille.

AZOULAY, E., CHOUTEAU, J. et DAVIDOVICS, G. (1963) Biochim. Biophys. Acta, *77*, 554.

AZOULAY, E., COUCHOUD-BEAUMONT, P. (1965) Biochim. Biophys. Acta, *110*, 301.

AZOULAY, E., COUCHOUD-BEAUMONT, P. et SENEZ, J.C. (1964) Ann. Inst. Pasteur, Paris, *107*, 520.

AZOULAY, E. et DUVNJAK, Z. (1971) Biochimie, *53*, 113.

AZOULAY, E. et HEYDEMAN, M.T. (1963) Biochim. Biophys. Acta, *77*, 545.

AZOULAY, E. et PUIG, J. (1968) Biochem. Biophys. Res. Commun., *33*, 1010.

AZOULAY, E. et SENEZ, J.C. (1958) C.R. Acad. Sc., *247*, 1251.

AZOULAY, E. et SENEZ, J.C. (1965) Abh. Deut. Akad. Wiss. Berlin, *2*, 93.

BAPTIST, J.N., GHOLSON, R.K. et COON, M.J. (1963) Biochim. Biophys. Acta, *69*, 40.

BARDLEY, W.G., HILL, C.M. et LOBLEY, R.W. (1970) Biochem. J., *117*, 169.

BEERSTECHER, E. (1954) "Petroleum Microbiology". Elsevier, Amsterdam.

BRUYN, J. (1954) Koninkl. Ned. Akad. Wetenschap. Proc. Ser. C *57*, 41.

CARDINI, G. et JURTSHUK, P. (1968) J. Biol. Chem., *243*, 6071.

CARDINI, G. et JURTSHUK, P. (1970) J. Biol. Chem., *245*, 2789.

CECIL, R. et LOUIS, C.F. (1970) Biochem. J., *117*, 139.

CECIL, R. et LOUIS, C.F. (1970) Biochem. J., *117*, 147.

CHAMPAGNAT, A., VERNET, C., LAINE, B. et FILOSA, J. (1963) Nature, *197*, 13.

CHOUTEAU, J., AZOULAY, E. et SENEZ, J.C. (1962) Nature, *194*, 576.

COONEY, A.H., BROWN, R.R., MILLER, J.A. et MILLER, E.C. (1957) Cancer Res., *17*, 628.

COOPER, J.R. et BRODIE, B.B. (1957) J. Pharmacol. Exp. Ther., *114*, 409.

COOPER, D.Y., LEVIN, S., NARASIMHULU, S., ROSENTHAL, O. et ESTABROOK, R.W. (1965) Science, *147*, 400.

CUSHMAN, D.W., TSAI, R.L. et GUNSALUS, I.C. (1967) Biochem. Biophys. Res. Commun., *26*, 577.

DAVIES, R. et ELVIN, P.A. (1964) Biochem. J., *93*, 8P.

DAVIS, J.B. (1967) Petroleum Microbiology. Elsevier Publishing Company, Amsterdam.

DUVNJAK, Z. (1970) Thèse, Faculté des Sciences de Marseille.

DUVNJAK, Z., LEBEAULT, J.M., ROCHE, B. et AZOULAY, E. (1970a) Biochim. Biophys. Acta, *202*, 447.

DUVNJAK, Z., ROCHE, B. et AZOULAY, E. (1970b) Arch. Mikrobiol., *72*, 135.

EDDY, A.A. et WILLIAMSON, D.H. (1957) Nature, *183*, 1101.

FOSTER, J.W. (1962) Antonie van Leeuwenhoek, *28*, 241.

GALLO, M., BERTRAND, J.C. et AZOULAY, E. (1971) FEBS Letters, *19*, 45.

GARFINKEL, D. (1958) Arch. Biochem. Biophys., *77*, 493.

GASCON, S., OCHOA, A.G. et VILLANUEVA, J.R. (1965) Can. J. Microbiol., *11*, 573.

GHOLSON, R.K., BAPTIST, J.N. et COON, M.J. (1963) Biochemistry, *2*, 1155.

GILETTE, J.R., BRODIE, B.B. et LADU, B.N. (1957) J. Pharmacol. Exp. Ther., *119*, 532.

HEYDEMAN, M.T. (1960) Biochim. Biophys. Acta, *42*, 557.

HEYDEMAN, M.T. et AZOULAY, E. (1963) Biochim. Biophys. Acta, *77*, 545.

HORECKER, B.L. (1950) J. Biol. Chem., *183*, 593.

HUYBREGTSE, R. et VAN DER LINDEN, A.C. (1964) Antonie van Leeuwenhoek, *30*, 185.

ISHIDATE, K., KAWAGUCHI, K., TAGAWA, K., et HAGIHARA, B.(1969a) J. Biochem., *65*, 375.

ISHIDATE, K., KAWAGUCHI, K. et TAGAWA, K. (1969b) J. Biochem., *65*, 385.

IIZUKA, H., IIDA, M. et TOYODA, S. (1966a) Z. Allgem. Mikrobiol., *6*, 335.

IIZUKA, H., IIDA, M. et UNAMI, Y. (1966b) J. Gen. Microbiol., *12*, 119.

IIZUKA, H., IIDA, M., UNAMI, Y. et HOSHINO, Y. (1968) Z. Allgem. Mikrobiol., *8*, 145.

IIZUKA, H., IIDA, M. et FUJITA, S. (1969) Z. Allgem. Mikrobiol., *9*, 223.

IMELICK, B. (1948a) C.R. Acad. Sci., *226*, 922.

IMELICK, B. (1948b) C.R. Acad. Sci., *226*, 1227.

KAMIN, H., MASTERS, B.S.S., GIBSON, Q.H. et WILLIAMS, C.H. (1964) Fed. Proc., *24*, 1164.

KATAGARI, M., GANGULI, B.N. et GUNSALUS, I.C. (1968) J. Biol. Chem., *243*, 3543.

KESTER, A.S. et FOSTER, J.W. (1963) J. Bacteriol., *85*, 859.

KIMURA, T. et SUZUKI, K. (1965) Biochem. Biophys. Res. Commun., *20*, 373.

KIMURA, T. et SUZUKI, K. (1967) J. Biol. Chem., *242*, 1967.

KLINGENBERG, M. (1958) Arch. Biochem. Biophys., *75*, 376.

KLUG, M.J. et MARKOVETZ, A.J. (1967) J. Bacteriol., *93*, 1847.

KLUG, M.J. et MARKOVETZ, A.J. (1968) J. Bacteriol., *96*, 1115.

KLUG, M.J. et MARKOVETZ, A.J. (1971) Adv. Microbial Physiol., *5*, 1.

KONOVALTSCHIKOFF-MAZOYER, M. et SENEZ, J.C. (1956) Ann. Inst. Pasteur, *91*, 60.

KOVAC, L., BEDNAROVA, H. et CREKSAK, M. (1968) Biochim. Biophys. Acta, *153*, 32.

KUSUNOSE, M., KUSUNOSE, E. et COON, M.J. (1964a) J. Biol. Chem., *239*, 1374.

KUSUNOSE, M., KUSUNOSE, E. et COON, M.J. (1964b) J. Biol. Chem., *239*, 2135.

KUSUNOSE, M., ICHIHARA, K., KUSUNOSE, E., NOZAKA, J. et MATSUMOTO, J., (1967) Agr. Biol. Chem., *31*, 990.

LANG, C.A., et NASON, A. (1959) J. Biol. Chem., *234*, 1874.

LEADBETTER, E.R. et FOSTER, J.W. (1960) Arch. Mikrobiol., *35*, 92.

LEBEAULT, J.M. et AZOULAY, E. (1970c) World Congress ISF and American Oil Chemists' Society, 202.

LEBEAULT, J.M. et AZOULAY, E. (1971) Lipids, *6*, 444.

LEBEAULT, J.M., LODE, E.T. et COON, M.J. (1971) Biochem. Biophys. Res. Commun., *42*, 413.

LEBEAULT, J.M., MEYER, F., ROCHE, B., et AZOULAY, E. (1970d) Biochim. Biophys. Acta, *220*, 386.

LEBEAULT, J.M., ROCHE, E. et AZOULAY, E. (1970b) X International Congress for Microbiology, Bf-4.

LEBEAULT, J.M., ROCHE, B., DUVNJAK, Z. et AZOULAY, E. (1969a) Antonie van Leeuwenhoek, *35*, Supplement : Yeast Symposium F33.

LEBEAULT, J.M., ROCHE, B., DUVNJAK, Z. et AZOULAY, E. (1969b) J. Bacteriol., *100*, 1218.

LEBEAULT, J.M., ROCHE, B., DUVNJAK, Z. et AZOULAY, E. (1970b) Arch. Mikrobiol., *72*, 140.

LEBEAULT, J.M., ROCHE, B., DUVNJAK, Z. et AZOULAY, E. (1970e) Biochim. Biophys. Acta, *220*, 373.

LINDENMAYE, A. et SMITH, L. (1964) Biochim. Biophys. Acta, *93*, 445.

LOWRY, O.H., ROSEBROUGH, N.J., FARR, A.L., et RANDALL, R.J. (1951) J. Biol. Chem., *193*, 265.

LU, A.Y.H. et COON, M.J. (1968) J. Biol. Chem., *243*, 1331.

LU, A.Y.H., JUNK, K.W. et COON, M.J. (1969) J. Biol. Chem., *244*, 3714.

LUTSTORF, U. et MEGNET, R. (1968) Arch. Biochem. Biophys., *126*, 933.

MARKOVETZ, A.J. et KALLIO, R.E. (1964) J. Bacteriol., *87*, 968.

MARTIN, R.G. et AMES, B.N. (1961) J. Biol. Chem., *236*, 1372.

MEGNET, R. (1967) Arch. Biochem. Biophys., *121*, 194.

McKENNA, E.J. et COON, M.J. (1970) J. Biol. Chem., *245*, 3882.

McKENNA, E.J. et KALLIO, R.E. (1965) Ann. Rev. Microbiol., *19*, 183.

MITCHELL, M.P. et HÜBSCHER, G. (1968) European J. Biochem., *7*, 90.

MIYOSHI, M. (1895) Jb. wiss. Bot., *28*, 269.

MOHAMMADZADEH, K.A., FEENEY, R.E., SAMUELS, R.B. et SMITH, L.M. (1967) Biochim. Biophys. Acta, *147*, 583.

MOHAMMADZADEH, K.A., FEENEY, R.E. et SMITH, L.M. (1969) Biochim. Biophys. Acta, *194*, 246.

NOVAES, M. et VILLANUEVA, J.R. (1963) Biochim. Biophys. Acta, *78*, 797.

OGINO, S., YANO, K., TAMURA, G. et ARIMA, K. (1965) Agr. Biol. Chem., *29*, 1009.

OMURA, T. et SATO, R. (1962) J. Biol. Chem., *237*, 1375.

OMURA, T. et SATO, R. (1964a) J. Biol. Chem., *239*, 2370.

OMURA, T. et SATO, R. (1964b) J. Biol. Chem., *239*, 2379.

OMURA, T., SATO, R., COOPER, D.Y., ROSENTHAL, G. et ESTABROOK, R.W. (1965) Fed. Proc., *24*, 1181.

ORRENIUS, S. et ERNSTER, L. (1967) Life Sciences, *6*, 1473.

PETERSON, J.A., BASU, D. et COON, M.J. (1966) J. Biol. Chem., *241*, 5162.

PETERSON, J.A. et COON, M.J. (1968) J. Biol. Chem., *243*, 329.

PETERSON, J.A., KUSUNOSE, M., KUSUNOSE, E. et COON, M.J. (1967) J. Biol. Chem., *242*, 4334.

PETERSON, J.A., McKENNA, E.J., ESTABROOK, R.W. et COON, M.J. (1969) Arch. Biochem. Biophys., *131*, 245.

PHILLIPS, A.H. et LANGDON, H.J. (1962) J. Biol. Chem., *237*, 2652.

PROCTOR, M.H. (1960) Biochim. Biophys. Acta, *42*, 559.

RAHN, O. (1906) Zbl. Bakteriol. Parasitende Abt. II, *16*, 382.

ROCHE, B. et AZOULAY, E. (1969) European J. Biochem., *8*, 426.

REYNOLDS, J., HERBERT, S. et STEINHARDT, J. (1968) Biochemistry, *7*, 1357.

SCHIMPFESSEL, L. (1968) Biochim. Biophys. Acta, *151*, 317.

SENEZ, J.C. (1969) Bull. Inst. Pasteur, *67*, 1771.

SENEZ, J.C. et AZOULAY, E. (1961a) Bact. Proc., C23.

SENEZ, J.C. et AZOULAY, E. (1961b) Biochim. Biophys. Acta, *47*, 307.

SENEZ, J.C., KONOVALTSCHIKOFF-MAZOYER, M. (1956) C.R. Acad. Sc., *242*, 2873.

SÖHNGEN, M.L. (1913a) Zbl. Bakteriol., Abt II, *37*, 595.

SÖHNGEN, M.L. (1913b) Zbl. Bakteriol., Abt. II, *38*, 621.

STEWART, J.E., FINNERTY, W.R., KALLIO, R.E. et STEVENSON, D.P. (1960) Science, N.Y., *132*, 1254.

STEWART, J.E., KALLIO, R.E., STEVENSON, D.P., JONES, A.C. et SCHISSLER, D.O. (1959) J. Bacteriol., *78*, 441.

SUND, H. et THEORELL, H. (1963) "The Enzymes", VOL. 7,p. 25, Academic Press, New York.

TANAKA, H. et PHAFF, H.J. (1965) J. Bacteriol., *89*, 1570.

THIJSSE, G.J.E. et VAN DER LINDEN, A.C. (1961) Antonie van Leeuwenhoek, *25*, 332.

THIJSSE, G.J.E. et VAN DER LINDEN, A.C. (1963) Antonie van Leeuwenhoek, *29*, 89.

VAN DER LINDEN, A.C. (1963) Biochim. Biophys. Acta, *77*, 157.

VAN DER LINDEN, A.C. et THIJSSE, G.J.E. (1965) Adv. Enzymol., *27*, 469.

VAN EYK, J. et BARTELS, T.J. (1968) J. Bacteriol., *96*, 706.

VERKADE, P.E., ELZAS, M., VAN DER LEE, J., DE WOLFF, H.H., VERKADE-SANDBERGEN, A. et VAN DER SANDE, D. (1932) Proc. Koninkl. Acad. Wetenschap., Amsterdam, *35*, 251.

VERKADE, P.E. et VAN DER LEE, J. (1934) Biochem. J., *28*, 31.

VERKADE, P.E., VAN DER LEE, J.E. et VAN ALPHEN, A.J.S. (1935a) Z. Physiol. Chem., *237*, 186.

VERKADE, P.E., VAN DER LEE, J. et VAN ALPHEN, A.J.S. (1935b) Z. Physiol. Chem., *247*, 111.

VOLFOVA, O., MUNCK, V. et DOSTALEK, M. (1968) Experientia, *23*, 1005.

WAGNER, F., ZAHN, W. et BUHRING, U. (1967) Angew. Chem. Int. Ed., *6*, 359.

WILLIAMS, C.C. et KAMIN, H. (1962) J. Biol. Chem., *237*, 1962.

ZOBELL, C.E. (1950) Adv. Enzymol., *10*, 443.

ZOBELL, C.E. (1946) Bacteriol. Rev., *10*, 1.

TABLE DES MATIERES

pages

INTRODUCTION 1

CHAPITRE I - Exposé bibliographique 3

Mécanismes biochimiques de dégradation des paraffines par les micro-organismes 4

1 - Oxydation des hydrocarbures par les cellules entières de micro-organismes 4

a) Les alcanes 4

b) Les alcènes 5

c) Oxydation diterminale des alcanes 8

2 - Oxydation des hydrocarbures par des préparations acellulaires 11

a) Les hydroxylases 11

3 - Hydroxylation des hydrocarbures par des extraits bactériens 15

Déshydrogénation des alcanes 17

CHAPITRE II - Matériel et Méthodes 20

1 - Organismes 20

2 - Milieux et conditions de culture 20

3 - Préparation des protoplastes 21

4 - Préparation des extraits enzymatiques 21

A - Choc osmotique et séparation des mitochondries 22

B - Traitement dans une cellule de pression 22

5 - Mesure des activités respiratoires 23

6 - Mesure des activités enzymatiques 23

a) Hydrocarbure-déshydrogénase 23

b) Alcool- et aldéhyde-déshydrogénases 25

c) Hydroxylation des acides gras et des alcanes 25

d) NADPH-cytochrome c réductase 26

7 - Recherche du cytochrome P_{450} 26

8 - Analyse qualitative des produits des réactions enzymatiques 27

a) Séparation du mélange n-décane et 1-décène 27

b) Séparation du mélange 1-décanol, décanal et acide décanoïque 27

c) Séparation du mélange n-décane, 1-décène, 1-décanol et 9-décène 1-Ol 27

d) Séparation du mélange 1-décanol, 9-décène-1-Ol, acide décanoïque 28

e) Séparation du mélange 1-10 décanediol acide 10-hydroxydécanoïque et acide décanedioïque 28

CHAPITRE III - Oxydation des alcanes par les cellules et les protoplastes de *C. tropicalis* 29

Introduction 29

1 - Etude sur les conditions de préparation des protoplastes de *C. tropicalis* 30

a) Traitement à l'hélicase 30

b) Traitement à la "strepzyme" 30

2 - Résultats de ces différentes méthodes 31

3 - Préparation des protoplastes par action des "strepzymes" 33

4 - Activité respiratoire des protoplastes de *C. tropicalis* cultivés sur n-tétradécane 35

Discussion 38

CHAPITRE IV - Déshydrogénation des alcanes par des extraits acellulaires de *C. tropicalis* 40

Introduction 40

1 - Mise en évidence d'une activité alcane-déshydrogénase dans les préparations acellulaires de *C. tropicalis*.... 40

2 - Etude des propriétés enzymatiques 41

3 - Influence du degré d'émulsion du décane sur l'activité enzymatique 44

4 - Spécificité de substrat 47

a) Nature de l'alcane 47

b) Action à l'égard des intermédiaires métaboliques .. 48

5 - Influence de certains inhibiteurs 49

6 - Influence de la température 49

Conclusions 52

CHAPITRE V - Hydroxylation des acides gras et des alcanes par *C. tropicalis* 54

1 - Mise en évidence d'une activité hydroxylase 54

2 - Propriétés du système enzymatique 55

3 - Analyse du système enzymatique 60
Conclusions 64

CHAPITRE VI - Alcool- et aldéhyde déshydrogénases de *C. tropicalis* cultivée sur hydrocarbure 65
Introduction 65
1 - Distribution de l'activité alcool-déshydrogénase particulaire de *C. tropicalis* 65
2 - Oxydation des alcools supérieurs par les extraits particulaires de *C. tropicalis* 66
3 - Autres propriétés de l'alcool-déshydrogénase particulaire de *C. tropicalis* 70
4 - Etude de l'activité aldéhyde-déshydrogénase des extraits particulaires 70
5 - Essais de séparation des activités alcool- et aldéhyde-déshydrogénases particulaires de *C. tropicalis* 75
6 - Mise en évidence d'une alcool-déshydrogénase soluble ... 75
7 - Etude cinétique de l'alcool-déshydrogénase soluble 78
Conclusions 84

CHAPITRE VII - Régulation des enzymes impliquées dans l'oxydation des alcanes 88
Introduction 88
1 - Activité alcane-déshydrogénase 88
2 - Système hydroxylase 90
3 - Alcool- et aldéhyde-déshydrogénases particulaires 94
4 - Alcool- et aldéhyde-déshydrogénases solubles 95
5 - Acyl-CoA-synthétases 95
Discussion et conclusions 96

CONCLUSIONS ET DISCUSSION GENERALES 98

BIBLIOGRAPHIE 104